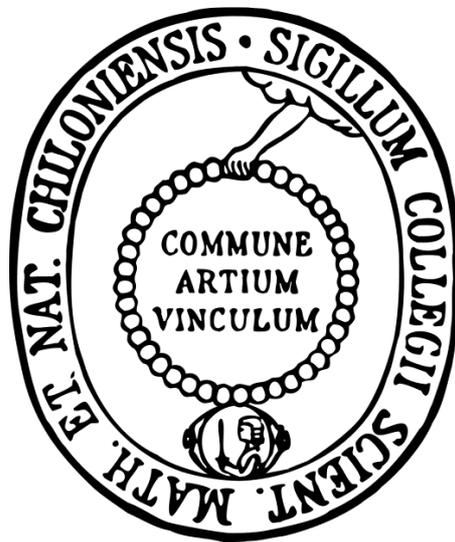


**Untersuchung der Umsetzung
asymmetrisch methylierter Arginine
durch rekombinant hergestellte und
native Dimethylarginin-
Dimethylaminohydrolase-2**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Karin Susanne Altmann

Kiel 2014

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Februar 2014

Zum Druck genehmigt:

03. Februar 2014

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl

(Dekan)

Folge nie der Menge, nur weil du Angst hast, anders zu sein.

Margaret Thatcher

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

VIII

1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit1

1.1 STICKSTOFFMONOXID 1

 1.1.1 Einleitung..... 1

 1.1.2 Physiologie..... 2

 1.1.3 Pathophysiologie 4

1.2 REGULATION DES NO-STOFFWECHSELS 5

 1.2.1 Allgemeine Übersicht 5

 1.2.2 L-Arginin..... 6

 1.2.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOSs)..... 7

 1.2.4 Arginasen 10

 1.2.5 Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) 12

 1.2.6 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen..... 13

1.3 THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG DER NO-KONZENTRATION 18

 1.3.1 Therapeutische Ansätze zur Steigerung der NO-Konzentration..... 19

 1.3.2 Therapeutische Ansätze zur Verminderung der NO-Konzentration 23

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT..... 28

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2..... 29

2.1 EINLEITUNG..... 29

 2.1.1 Rekombinante Herstellung der humanen DDAH..... 29

 2.1.2 Zielsetzung der Arbeit 31

2.2 MATERIALIEN UND GERÄTE 32

2.3 METHODEN 32

 2.3.1 Molekularbiologische Methoden..... 32

 2.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 32

 2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA 32

 2.3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)..... 33

 2.3.1.4 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen 35

2.3.1.5	Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese	35
2.3.1.6	Aufreinigung von DNA	36
2.3.1.7	Glätten von überhängenden DNA-Enden (<i>Blunting</i>)	36
2.3.1.8	Ligation	37
2.3.1.9	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.3.1.10	Transformation von kompetenten Zellen	37
2.3.1.10.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.3.1.10.2	Transformation von <i>D. discoideum</i> mittels Elektroporation	38
2.3.1.11	Blau-Weiß-Screening	38
2.3.1.12	Sequenzierung	39
2.3.1.12.1	DNA-Sequenzierung mit LI-COR™ <i>DNA Sequencer</i>	39
2.3.1.12.2	DNA-Sequenzierung mit Beckman CEQ™ <i>DNA Sequencer</i>	41
2.3.1.13	<i>In vitro</i> Mutagenese	41
2.3.2	Proteinchemische Methoden	42
2.3.2.1	manuelle Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA	42
2.3.2.1.1	Native Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	43
2.3.2.1.2	Denaturierende Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	43
2.3.2.2	FPLC-basierte Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	43
2.3.2.3	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	44
2.3.2.4	Proteingehaltsbestimmung	44
2.3.2.4.1	Proteinbestimmung mit Bio-Rad-Reagenz	44
2.3.2.4.2	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	45
2.3.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.3.2.6	Western Blot	46
2.3.2.6.1	Elektroblot	46
2.3.2.6.2	Immunologische Detektion	46
2.3.2.6.3	Färbung der Membranen	47
2.3.2.7	Thrombinverdau	47
2.3.2.7.1	Zeitabhängigkeit des Thrombinverdaus	47
2.3.2.7.2	Abhängigkeit des Verdaus von Temperatur und Thrombinmenge	47
2.3.3	Zellkulturarbeiten	48
2.3.3.1	Zellkultur von <i>Escherichia Coli</i>	48
2.3.3.1.1	Anlegen von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	48
2.3.3.1.2	Screening auf optimal Bedingungen der Proteinbildung in <i>E. coli</i>	48
2.3.3.1.3	Proteinherstellung in <i>E. coli</i> -Großkulturen	49

Inhaltsverzeichnis

2.3.3.1.4	Herstellung von <i>E. coli</i> -Zelllysaten	49
2.3.3.1.5	Präparation von Proteinfractionen	50
2.3.3.2	Zellkultur von <i>Dictyostelium discoideum</i>	50
2.3.3.2.1	Keimung von Sporen-Dauerkulturen	50
2.3.3.2.2	Mediumswechsel.....	50
2.3.3.2.3	Passagieren von Zellen.....	51
2.3.3.2.4	Klone picken.....	51
2.3.3.2.5	Geneticinselektion	51
2.3.3.2.6	Anlegen von Flüssig-Schüttelkulturen.....	51
2.3.3.2.7	Bestimmung der Zellzahl und der Generationszeit.....	52
2.3.3.2.8	Herstellung von <i>D. discoideum</i> -Zelllysaten.....	52
2.3.3.2.9	Anlegen von Sporendauerkulturen.....	52
2.3.4	Fluoreszenzmessungen und Fluoreszenzmikroskopie.....	53
2.3.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.....	53
2.3.4.2	In-Gel-Fluoreszenzmessung	53
2.3.4.3	Fluoreszenzmessung in Mikrotiterplatten	53
2.3.5	Stabilitätsanalytik von GFP.....	54
2.3.5.1	Temperaturstabilität	54
2.3.5.2	Einfrier-Auftau-Stabilität.....	54
2.3.5.3	pH-Stabilität	54
2.3.6	Aktivitätsstudien an rekombinanten Enzymen.....	55
2.3.6.1	<i>In vitro</i> Aktivitätsassay mit HPLC-Analytik.....	55
2.3.6.1.1	<i>In vitro</i> Aktivitätsassay in Eppendorfreaktionsgefäßen	55
2.3.6.1.2	HPLC-Analytik.....	55
2.3.6.1.3	Kalibrierung und Wiederfindung	56
2.3.6.2	Kolorimetrischer L-Citrullin Plattenreader-Assay	57
2.3.6.2.1	<i>In vitro</i> Aktivitätsassay in der Mikrotiterplatte	57
2.3.6.2.2	Derivatisierung	57
2.3.7	Klonierungsarbeiten/Mutationen.....	58
2.4	ERGEBNISSE	63
2.4.1	Rekombinante Herstellung von hDDAH-2 in <i>E. coli</i>	63
2.4.1.1	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für N-terminal His-getaggte hDDAH-2	63

2.4.1.2	Etablierung einer nativen Reinigungsmethode für His-getaggte hDDAH-2 aus der cytosolischen Fraktion von <i>E. coli</i>	67
2.4.1.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> Aktivität rekombinant hergestellter His-getaggtter hDDAH-2.....	70
2.4.1.4	Untersuchungen an einer rekombinant hergestellten N-terminal verlängerten His- <i>tag</i> hDDAH-2.....	74
2.4.1.5	Herstellung und Reinigung beidseitig His-getaggtter hDDAH-2 in <i>E. coli</i>	76
2.4.1.5.1	Herstellung von beidseitig His-getaggtter hDDAH-2.....	77
2.4.1.5.2	Herstellung einer N-terminal His-GST- und C-terminal His-getaggtten hDDAH-2.....	80
2.4.2	Versuche zur gesteigerten Herstellung löslicher hDDAH-2 in <i>E. coli</i> durch Ausnutzung <i>E. coli</i> -eigener Chaperone.....	82
2.4.2.1	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für hDDAH-2-Chaperonfusionsproteine	82
2.4.2.2	Native Reinigung des GroEL-hDDAH-2-Fusionsproteins aus der cytosolischen Fraktion von <i>E. coli</i>	88
2.4.2.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> Aktivität des rekombinant hergestellten GroEL-hDDAH-2-Fusionsproteins	90
2.4.2.4	Abspaltung des GroEL-Restes vom gereinigten hDDAH-2-Fusionsprotein	92
2.4.3	Untersuchungen zur Faltung der hDDAH-2 bei Herstellung in <i>E. coli</i>	95
2.4.3.1	Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für C-terminal GFP-getaggtter hDDAH-2	95
2.4.3.2	Denaturierende Reinigung von hDDAH-2-GFP	98
2.4.3.3	Stabilitätsanalytik von GFP	100
2.4.3.4	Herstellung von mutierten GFP-hDDAH-Fusionsproteinen.....	104
2.4.4	Rekombinante Herstellung N-terminal His-getaggtter hDDAH-2 in Anlehnung an Leiper <i>et al.</i> , 1999	106
2.4.4.1	Vergleichende Herstellung und Untersuchung N-terminal His-getaggtter hDDAH-2.....	107
2.4.4.2	Untersuchung der Reinigung N-terminal His-getaggtter hDDAH-2.....	110
2.4.5	Rekombinante Herstellung GFP-getaggtter hDDAH-2 in <i>Dictyostelium discoideum</i>	112
2.4.5.1	Voruntersuchung von <i>D. discoideum</i>	112
2.4.5.2	Herstellung von GFP-hDDAH-2-Fusionsproteinen.....	113

3.4.2.3	Hemmung der endogenen DDAH-Aktivität	155
3.4.2.4	Umsetzung postulierter und alternativer DDAH-Substrate	156
3.4.3	Beeinflussung der DDAH-Aktivität im porcinen Gewebe	157
3.4.3.1	Einfluss von porcinen Geweben auf die Aktivität reiner, rekombinant hergestellter hDDAH-1	157
3.4.3.2	L-Citrullin-Verbrauch im porcinen Gewebe	158
3.5	DISKUSSION	161
3.5.1	Vorkommen und Lokalisation der porcinen DDAH	161
3.5.2	DDAH-Aktivität	162
3.6	ZUSAMMENFASSUNG	168
4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	170
5.	Material und Geräte	176
5.1	ENZYME, KITS UND CHEMIKALIEN	176
5.2	GERÄTE UND MATERIALIEN	178
5.3	DNA-SEQUENZEN	182
5.4	OLIGONUCLEOTIDE (PRIMER)	182
5.4.1	Sequenzierprimer.....	182
5.4.2	Klonierungsprimer	183
5.4.3	Mutageneseprimer	184
5.5	PLASMIDE	184
5.6	<i>ESCHERICHIA COLI</i> -STÄMME.....	190
5.7	<i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> -STÄMME	190
5.8	ANTIKÖRPER.....	190
5.8.1	Primärantikörper.....	190
5.8.2	Sekundärantikörper.....	191
5.9	PUFFER UND LÖSUNGEN	192
5.9.1	Molekularbiologie.....	192
5.9.2	Nährmedien und Puffer für die Zellkultur	192

Inhaltsverzeichnis

5.9.3 Allgemeine Proteinchemie.....	194
5.9.4 Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	195
5.9.5 Thrombinverdau	197
5.9.6 Stabilitätsanalytik GFP	197
5.9.7 Aktivitätsassay.....	197
5.9.8 Präparation zellulärer Subfraktionen porciner Gewebe.....	198
6. Literaturverzeichnis	199

Abkürzungsverzeichnis

AbMEG	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N</i> ^ω -(2-methoxyethyl)guanidin
ADMA	Asymmetrisches <i>N</i> ^ω , <i>N</i> ^{ω'} -Dimethyl-L-arginin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Argininosuccinat-Synthase
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
AU	<i>arbitrary units</i>
BamHI	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Bettvolumina
Cm	Chloramphenicol
CYP	Cytochrom P450-Enzyme
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DMA	Dimethylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DnaK	<i>E. coli</i> Chaperon, Hitzeschock-Protein 70
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli RY13</i>
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

Abkürzungsverzeichnis

FMN	Flavin-Mononukleotid
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GroEL	<i>E. coli</i> Chaperon, Hitzeschock-Protein 60
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HindIII	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae Rd</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HTS	<i>high throughput screening</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
KpnI	Restriktionsendonuklease aus <i>Klebsiella pneumoniae OK8</i>
L-257	<i>N</i> ^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin
L-Arg	L-Arginin
mARC	mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NcoI	Restriktionsendonuklease aus <i>Nocardia corallina</i>
Ni ²⁺ -NTA	Nickel ⁽²⁺⁾ -Nitrilotriessigsäure
NMMA	<i>N</i> ^{ω} -Monomethyl-L-arginin
NOHA	<i>N</i> ^{ω} -Hydroxy-L-arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD ₆₀₀	Absorption bei $\lambda = 600$ nm (optische Dichte einer Zellsuspension)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen	Penicillin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PstI	Restriktionsendonuklease aus <i>Providencia stuartii</i> 164
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>o</i> -PA	ortho-Phthaldialdehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDMA	Symmetrisches $N^{\omega}, N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde(n)
siRNA	<i>small-interfering</i> RNA
SmaI	Restriktionsendonuklease aus <i>Serratia marcescens</i> Sb
SMTC	S-Methyl-L-thiocitrullin
SPB	Sörensen-Phosphat-Puffer
SDD	Schilddrüse
Strep	Streptomycin
TBST	<i>tris buffered saline</i> mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge/Ultrazentrifugation
VDAC-2	mitochondrialer <i>voltage dependent anion channel</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vinyl-NIO	N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin
XbaI	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas badrii</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XhoI	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas holcicola</i>
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 Stickstoffmonoxid

1.1.1 Einleitung

Im Jahre 1980 entdeckten Furchgott *et al.*, dass Endothelzellen einen unbekanntem, instabilen Stoff zur Vasodilatation freisetzen und nannten ihn *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) (Furchgott, 1996; Cherry *et al.*, 1982). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass Nitrate wie Glyceroltrinitrat oder Nitroprussid-Natrium auf Grund einer spontanen oder enzymatischen Freisetzung von Stickstoffmonoxid eine relaxierende Wirkung auf die Gefäße haben (Moncada *et al.*, 1991). Sie wurden daher bereits unter anderem zur Therapie des Bluthochdrucks und der Angina pectoris eingesetzt.

Mit der Identifizierung von EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) legten Furchgott und Ignarro 1987 den Grundstein für umfangreiche Forschungsarbeiten (Furchgott, 1996; Ignarro *et al.*, 1987). Ihre Ergebnisse machten NO 1992 zum "Molekül des Jahres" (Koshland, 1992) und führten zur Ehrung von Furchgott, Ignarro und Murad mit dem Nobelpreis für Medizin 1998 für ihre herausragenden Forschungsarbeiten auf dem Gebiet von EDRF/NO (SoRelle, 1998).

Stickstoffmonoxid ist ein farbloses Gas, das als stark lipophiles und elektrisch neutrales Molekül *in vivo* sehr gut durch Membranen diffundieren kann (Furchgott, 1996; Ignarro *et al.*, 1999). Durch seinen radikalischen Charakter reagiert es in wässriger Lösung sehr schnell mit Superoxidanionen zu Peroxynitrit oder wird mit Sauerstoff zu Nitrit und Nitrat oxidiert (Rubanyi & Vanhoutte, 1986; Palmer *et al.*, 1987). Außerdem besitzt NO eine starke Affinität zu Eisen- und Kupferionen im Zentrum von Proteinkomplexen (Knipp, 2006). So reagiert NO mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin, eine Reaktion, die auch dem Nachweis von NO dient (Doyle & Hoekstra, 1981). Darüber hinaus stellt die Nitrosylierung von schwefelhaligen Aminosäuren durch NO eine wichtige posttranslationale Modifikation zur Regulation von Proteinfunktionen dar (Loscalzo, 2013).

Die vielfältigen Inaktivierungswege führen zu einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden für freies Stickstoffmonoxid im Organismus (Moncada *et al.*, 1991). Dadurch wird die lokale Wirkung begünstigt. Trotz der kurzen Halbwertszeit ist eine ausreichende Konzentrierung am Wirkort in Folge der guten Permeabilität möglich.

1.1.2 Physiologie

In den Gefäßen wirken die Scherkräfte des Bluts als physiologischer Reiz für die endogene Bildung von NO (Moncada *et al.*, 1991). Dieser Reiz führt über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Calcium-abhängigen Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Ignarro *et al.*, 1999). Außerdem aktivieren Transmitter wie Bradykinin und Acetylcholin die NO-Freisetzung aus den Gefäßen (s. Abbildung 1.1). Stickstoffmonoxid kann unter sauren Bedingungen im Gewebe, z.B. bei einer Ischämie, auch nicht-enzymatisch aus Nitrit gebildet werden (Zweier *et al.*, 1995). Das gebildete NO kann aus den Endothelzellen direkt zu den darunter liegenden Zellen der glatten Muskulatur diffundieren oder zu den naheliegenden Erythrozyten und Thrombozyten im Blut. So wirkt es als lokaler Mediator des Blutflusses und der Hämostase (Ignarro *et al.*, 1999).

Die vasorelaxierenden Funktionen des NO werden hauptsächlich über die Reaktion mit dem zentralen Eisen-Hämoglobin der löslichen Guanylatcyclase (sGC; EC 4.6.1.2) vermittelt (Arnold *et al.*, 1977). Die Reaktion von NO mit der sGC führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, die die Affinität zum Guanosintriphosphat (GTP) um das 200-400fache erhöht (Murad, 2008). Aus GTP wird durch die sGC cyclisches GMP (cGMP) gebildet, das verschiedene Kinasen aktiviert (s. Abbildung 1.1). Besonders die Proteinkinase G (PKG; EC 2.7.11.12) sorgt über eine Phosphorylierung von Proteinen und der Absenkung des intrazellulären Calcium-Spiegels an der glatten Muskulatur der Gefäße für eine Vasodilatation (Moncada *et al.*, 1991). Über andere Kinasen werden die antiproliferativen Effekte von NO auf die glatte Muskulatur vermittelt.

Zusätzlich bewirkt NO so eine Hemmung der Thrombozyten- und Leukozytenaggregation (Radomski *et al.*, 1987; Furchgott, 1996). Deshalb besitzt NO in physiologischen Konzentrationen wichtige regulatorische Funktionen für Blutdruck und Blutfluss und bedeutende anti-atherosklerotische Eigenschaften.

1. Einleitung

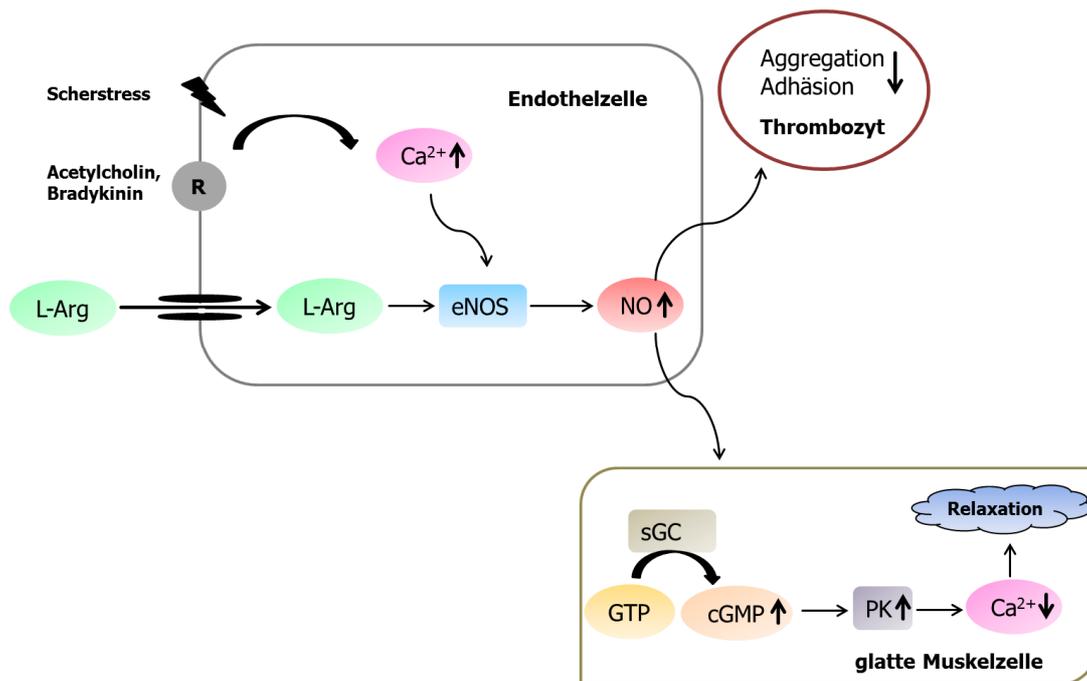


Abbildung 1.1: Schema der NO-Bildung im Endothel und der Wirkung von NO auf die glatte Muskulatur und die Thrombozyten.

eNOS: endotheliale NOS. GTP: Guanosintriphosphat. cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat. L-Arg: L-Arginin. NO: Stickstoffmonoxid. PK: Proteinkinase sGC: lösliche Guanylat-cyclase. R: Rezeptor.

Im zentralen und peripheren Nervensystem ist NO ein wichtiger Neurotransmitter. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird NO nach Aktivierung von Synapsen durch die neuronale NOS (nNOS) gebildet. Es reguliert die Durchblutung des Gehirns und ist an Prozessen des Lernens und der Gedächtnisausbildung beteiligt (Moncada *et al.*, 1991). Im peripheren Nervensystem moduliert NO als Transmitter an nichtadrenergen-nichtcholinergen (NANC) Neuronen die Peristaltik von Magen und Darm und relaxiert den Magen und die Sphinkteren. Auch im Corpus cavernosum wird die Freisetzung von NO zur Relaxation der glatten Muskulatur über NANC-Neurone gesteuert (Rajfer *et al.*, 1992).

Stickstoffmonoxid spielt als Teil der unspezifischen Immunabwehr eine wichtige Rolle im Immunsystem. Von Immunzellen freigesetzte Zytokine und Endotoxine der Erreger führen unter anderem in Makrophagen zur verstärkten Bildung der induzierbaren NOS (iNOS) (Colasanti & Suzuki, 2000). Dadurch wird die Bildung von NO in kurzer Zeit drastisch gesteigert. Seine direkten zytotoxischen Effekte vermittelt NO über eine Interaktion mit eisenhaltigen Enzymen der Atmungskette z.B.

Cytochrom c (Ghafourifar & Cadenas, 2005). Außerdem reagiert NO mit Superoxidationen ($\cdot\text{O}_2^-$) zu Peroxynitrit (ONOO^-), welches eine Schädigung der Krankheitserreger durch Oxidation oder Nitrierung der DNA oder Proteine bewirkt (Murad, 2008).

1.1.3 Pathophysiologie

Während NO in geringen Konzentrationen eine Schutzwirkung im Gefäßsystem hat und als Neurotransmitter fungiert, besitzt es in höheren Konzentrationen zytotoxische Eigenschaften. Daher spricht man auch vom dualen Charakter des NO (Colasanti & Suzuki, 2000).

So sind erhöhte Konzentrationen an NO insbesondere durch die Bildung des sehr reaktiven Peroxynitrits mit der Entstehung von Diabetes, Krebs oder entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa assoziiert (Babu & Griffith, 1998a; Ignarro *et al.*, 1999). Eine durch iNOS-Aktivierung bedingte, stark gesteigerte NO-Synthese kann in Folge der massiven Vasodilatation zur Ausbildung eines septischen Schocks führen (Thiemermann, 1997). Eine Zellschädigung durch NO liegt auch bei entzündlichen und degenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und bei Epilepsie vor (Duncan & Heales, 2005). So wurde gezeigt, dass hohe cGMP-Konzentrationen im Hippocampus zu epileptoformen Reaktionen bei pyramidalen Neuronen führen (Moncada *et al.*, 1991). Des Weiteren triggert NO neuronale Entzündungen und trägt dadurch zur Ausbildung der Migräne bei (Olesen, 2010).

Eine verminderte Bildung oder ein verstärkter Abbau von NO steigert die Proliferation der glatten Muskulatur der Gefäße und reduziert die Vasorelaxation (Böger, 2004). Aus der verminderten Gefäßdilataion resultiert eine Hypertonie. Die gesteigerte Proliferation der Muskelzellen führt zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. der Herzinsuffizienz spielt (Zoccali, 2007). Darüber hinaus schwächt ein Defizit in der NO-Bildung die unspezifische Immunabwehr.

1. Einleitung

1.2 Regulation des NO-Stoffwechsels

1.2.1 Allgemeine Übersicht

Die Bildung von Stickstoffmonoxid erfolgt im Körper aus L-Arginin durch verschiedene Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS; EC 1.14.13.39) über das physiologische Intermediat N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) (Palmer *et al.*, 1988). Die Oxidation von NOHA zu NO und L-Citrullin kann neben der NOS auch durch Cytochrom P450 erfolgen (Boucher *et al.*, 1992). NOHA kann allerdings auch wieder durch das Enzym *mitochondrial reducing component* (mARC) zu L-Arginin reduziert werden (Kotthaus, *et al.*, 2011b).

An der Regulation der NO-Synthese sind auch noch die Arginase (EC 3.5.3.1) und die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH; EC 3.5.3.18) beteiligt (s. Abbildung 1.2). Die Arginase konkurriert mit der NOS um das Substrat L-Arginin und kann so die NO-Bildung reduzieren (Durante *et al.*, 2007). Das Intermediat der NO-Synthese, N^{ω} -Hydroxy-L-arginin wiederum ist ein potenter Arginase-Hemmer (Boucher *et al.*, 1994). Die DDAH baut die endogenen NOS-Inhibitoren N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) und $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA) ab (Ogawa *et al.*, 1987; MacAllister *et al.*, 1996). Die methylierten Arginine entstehen durch den proteolytischen Abbau von Proteinen, bei denen zuvor enthaltenes Arginin durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT, EC 2.1.1.125) methyliert wurde (Anthony *et al.*, 2005). Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Stoffwechselwege und die beteiligten Enzyme.

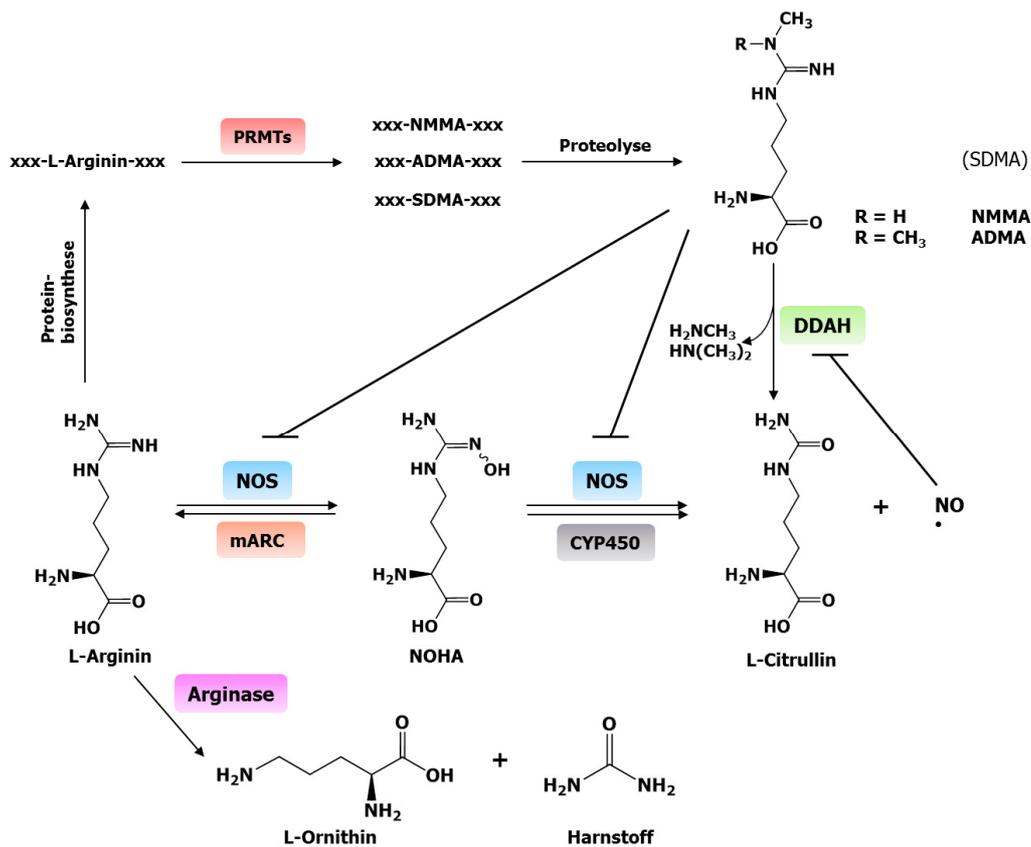


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Regulation des NO-Stoffwechsels.

ADMA: $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin. CYP450: Cytochrom P450-Enzyme. DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase. L-NMMA: N^{ω} -Monomethyl-L-arginin. mARC: *mitochondrial reducing component* NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat. NOHA: N^{ω} -Hydroxy-L-arginin. NOS: NO-Synthasen. PRMTs: Protein-Arginin-Methyltransferasen. SDMA: $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin.

1.2.2 L-Arginin

L-Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure. Sie kann über die Nahrung aufgenommen, durch Proteinabbau freigesetzt oder physiologisch aus L-Citrullin über die Enzyme Argininosuccinat-Synthase (ASS, EC 6.3.4.5) und Argininosuccinat-Lyase (EC 4.3.2.1) gebildet werden (Wu & Morris, 1998; Hallemeesch *et al.*, 2002). Kinder in der Wachstumsphase und Menschen mit stark kataboler Ernährungslage z.B. bei Infektionen haben einen erhöhten Bedarf an L-Arginin und benötigen eine Supplementierung.

Für die Bildung von NO werden lediglich 1,2 % des Plasmaarginins benötigt (Castillo *et al.*, 1996). Der Großteil der Aminosäure dient der Proteinbiosynthese. Weiterhin entsteht aus Arginin durch die Arginase Harnstoff und L-Ornithin. L-Ornithin wird ne-

1. Einleitung

ben Guanidinoacetat auch bei der Umsetzung von L-Arginin mit L-Glycin durch die Arginin-Glycin-Amidino-transferase (EC 2.1.4.1) gebildet (Morris, 2004). Das Guanidinoacetat wird physiologisch weiter zu Kreatin umgesetzt. Aus Ornithin werden durch weitere Enzyme L-Prolin, L-Glutamat und Polyamine für das Zellwachstum gebildet (Hallemeesch *et al.*, 2002).

1.2.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOSs)

Bei den NO-Synthasen (NOSs; EC 1.14.13.39) handelt es sich um Monooxygenasen, die die Umwandlung von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und L-Citrullin in einer zwei-stufigen Reaktion katalysieren (s. Abbildung 1.3). Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) gibt Elektronen an die NOS ab, die zur Hydroxylierung eines endständigen Stickstoffatoms der Guanidinstruktur von L-Arginin benötigt werden. Daraufhin bildet sich das Intermediat der NO-Synthese *N*^ω-Hydroxy-L-arginin. Dieses wird im zweiten Schritt unter Sauerstoffverbrauch zu NO und L-Citrullin gespalten (Alderton *et al.*, 2001).

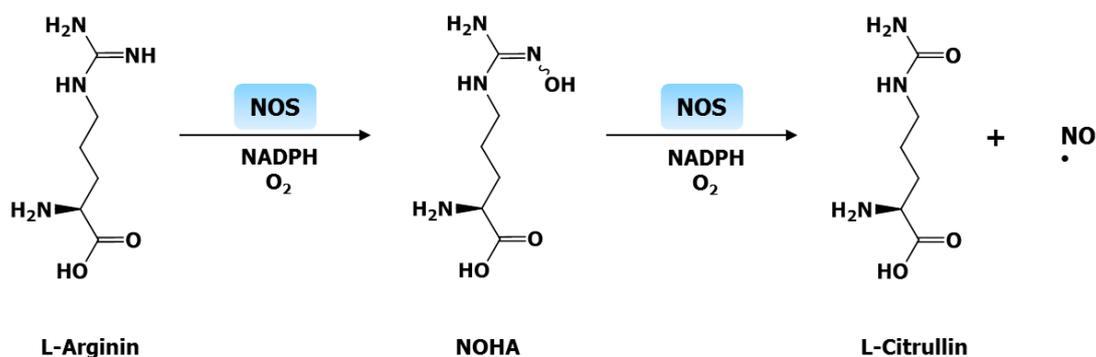


Abbildung 1.3: Umsetzung von L-Arginin durch NOSs.

NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat. NOHA: *N*^ω-Hydroxy-L-arginin. NOS: NO-Synthase.

Von der NOS sind drei Isoformen bekannt, die eine Sequenzhomologie von 51-57 % aufweisen und auf verschiedenen Genen kodiert sind. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebelokalisation, ihrer katalytischen Eigenschaften, ihres Cofaktor-Bedarfs und ihrer Sensibilität gegenüber Inhibitoren (Alderton *et al.*, 2001).

Man unterscheidet die konstitutiv gebildete neuronale NOS (nNOS; NOS-1) und endotheliale NOS (eNOS; NOS-3) von der induzierbaren NOS (iNOS; NOS-2). Die konstitutiven NOSs wurden nach den Geweben ihrer Entdeckung und hauptsächli-

chen Lokalisation benannt. Die nNOS befindet sich überwiegend im Nervengewebe und Gehirn, die eNOS in den Endothelzellen und die iNOS in den Makrophagen.

Bei der iNOS und der nNOS handelt es sich um zytosolische Enzyme, während die eNOS über Myristyl- und Palmitylanker am N-Terminus membranassoziiert ist (Michel, 1999).

In den letzten Jahren wurden noch weitere NOS-Proteine entdeckt, deren Zuordnung bisher unklar ist. In der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die mitochondriale NOS (mtNOS), die durch ihre Nähe zum Cytochrom c der Atmungskette an der Regulation der Endoxidation beteiligt ist (Ghafourifar & Cadenas, 2005). Die erythrozytäre NOS weist eine hohe Ähnlichkeit zur eNOS auf und ist daher auch an der Regulation der Thrombozytenaggregation beteiligt (Kleinbongard *et al.*, 2006). Da für beide Enzyme noch keine eigenen Gene identifiziert wurden, ist unklar, ob sie eigenständige NOS-Isoformen darstellen oder Unterform der bisherigen NOSs sind (Alderton *et al.*, 2001).

Grundsätzlich sind alle NOSs aus zwei Domänen aufgebaut und unterscheiden sich nur geringfügig im weiteren Aufbau. Am N-Terminus der NOS befindet sich eine Oxygenasedomäne, die die Bindestellen für Häm, Tetrahydrobiopterin (BH₄) und L-Arginin enthält (s. Abbildung 1.4). Hier wird die Umwandlung von L-Arginin zu NO und L-Citrullin katalysiert. Die Reduktasedomäne am C-Terminus des Enzyms enthält die Bindestellen für Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und NADPH. Beide Domänen sind über ein Bindemotiv für Calmodulin verknüpft (Alderton *et al.*, 2001).

1. Einleitung

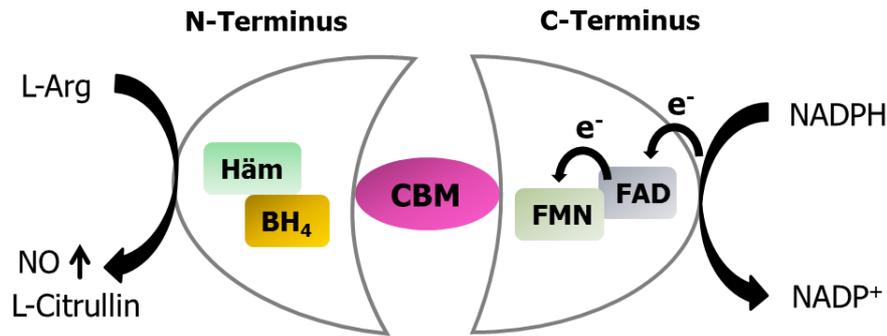


Abbildung 1.4: Schema eines NOS-Monomers modifiziert nach Alderton *et al.*, 2001.

BH₄: Tetrahydrobiopterin. CBM: Calmodulin-Bindemotiv. e⁻: Elektron. FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid. FMN: Flavin-Mononukleotid. L-Arg: L-Arginin. NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat. NO: Stickstoffmonoxid

NOS-Enzyme sind Monomere, die nur als Homodimere aktiv sind. Das liegt daran, dass der Elektronenübertrag vom NADPH über die Flavine der Reduktase-Domäne eines NOS-Monomers nur auf das Häm der Oxygenase-Domäne eines anderen NOS-Monomers erfolgt (Siddhanta, 1998). Dabei bindet an jedem Monomer einmal Calmodulin, das den Elektronentransport beschleunigt. Bei der eNOS und nNOS ist zur Dimerisierung Calcium nötig, das mit Calmodulin komplexiert (Ghafourifar & Cadenas, 2005). Aktivatoren der intrazellulären Calciumerhöhung sind bei der eNOS unter anderem Acetylcholin und Bradykinin und bei der nNOS Glutamat (Knowles & Moncada, 1994). Die iNOS besitzt eine so hohe Affinität zu Calmodulin, dass kein Calcium zur Aktivierung nötig ist.

Sowohl das Häm als auch BH₄ haben wichtige Funktionen in der Dimersierung der NOS (Alderton *et al.*, 2001). Außerdem fördert BH₄ die Substratanlagerung an die NOS und fungiert in der Umwandlung von L-Arginin zu NOHA als essentieller Cofaktor (Crabtree & Channon, 2011). Fehlt BH₄ oder ist die Konzentration von L-Arginin vermindert, kommt es zur Entkopplung des katalytischen Mechanismus mit Freisetzung von Superoxidanionen (Knowles & Moncada, 1994). Die parallele Freisetzung von NO und Superoxidanionen resultiert in der Bildung des schädlichen Peroxynitris (Stuehr, 2004; Rubanyi & Vanhoutte, 1986).

Bei hohen Konzentrationen von NO hemmen sich die NOS-Enzyme im Sinne eines negativen Feedbacks selbst, da das NO auch am Häm der NOS binden kann (Buga

et al., 1993). Eine Regeneration der Enzyme erfolgt durch Zufuhr von Sauerstoff oder Zerfall des Häm-NO-Komplexes.

1.2.4 Arginasen

Die ubiquitär verbreiteten Arginasen (EC 3.5.3.1) katalysieren die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff (s. Abbildung 1.5). Über diese Reaktion werden im Menschen ca. 30 g Harnstoff pro Tag generiert (Ash, 2004). Mit dieser Reaktion hat die Arginase eine fundamentale Bedeutung im Stickstoff-Stoffwechsel und bei der Ammoniak-Entgiftung des Körpers (Jenkinson *et al.*, 1996).

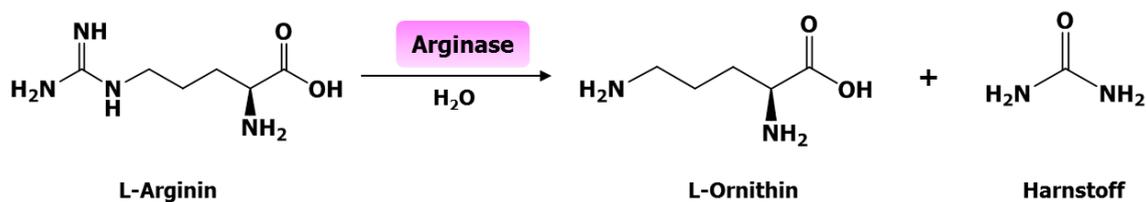


Abbildung 1.5: Umsetzung von L-Arginin durch Arginase.

Im Menschen liegt die Arginase als Homotrimer vor, die in jeder Untereinheit ein katalytisches Zentrum mit zwei Mn^{2+} -Atomen enthält (s. Abbildung 1.6). Das Mangan ist wichtig für die enzymatische Aktivität der Arginase, wobei in anderen Spezies auch Ni^{2+} -, Co^{2+} - oder Fe^{2+} -Ionen an Stelle des Mangans zu finden sind (Ash, 2004). Die beiden Manganionen sind im Ruhezustand über ein Hydroxid-Ion verbrückt und über Aspartat- und Histidinreste im aktiven Zentrum gebunden. L-Arginin wird nukleophil am Guanidiniumkohlenstoff durch das Hydroxid-Ion angegriffen und ein tetrahedralearer Übergangszustand gebildet. Dieser zerfällt nach Protonenabgabe vom Histidin im weiteren Verlauf der Reaktion zu L-Ornithin und Harnstoff (Kanyo *et al.*, 1996). Das pH-Optimum der Arginase liegt im Alkalischen zwischen 9 und 10 (Nishimura *et al.*, 1991).

1. Einleitung

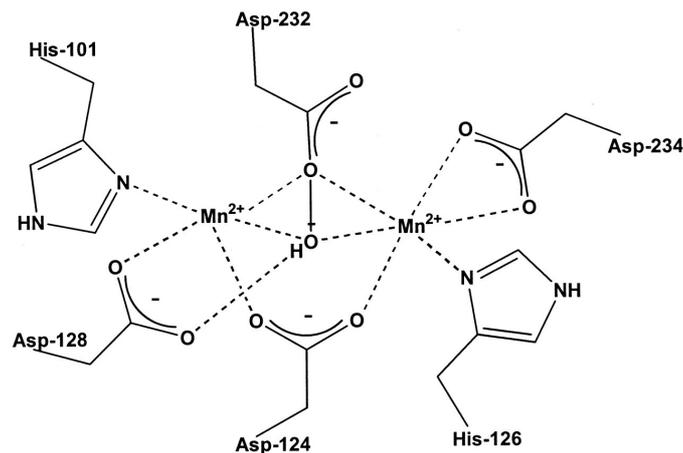


Abbildung 1.6: Mangancluster der Arginase I aus der Ratte (Ash, 2004).

Man unterscheidet bei der Arginase zwei Isoformen: Die cytosolische Arginase I und die mitochondriale Arginase II (Ash, 2004). Die Arginase I stellt ein wichtiges Enzym des Harnstoffzyklus in der Leber dar. Da das Enzym dort erstmalig entdeckt wurde, wird es häufig auch als Leberarginase bezeichnet. Die Arginase II weist zur Isoform I eine Sequenzidentität von 58 % auf und wurde in der Niere entdeckt. Dort ist Arginase II hauptsächlich an der Bereitstellung von L-Ornithin für die Synthese von Prolin und Polyaminen beteiligt (Yip & Knox, 1972). Beide Enzyme wurden auch im Endothel, der glatten Muskulatur und den Arterien nachgewiesen (Durante *et al.*, 2007).

Durch den Nachweis der Arginase in diesen Geweben wurde eine Beteiligung an der Regulation der NO-Bildung und der Gefäßfunktion postuliert (Nishimura *et al.*, 1991). Zwischen der Arginase und den NOS kommt es in zahlreichen Zellen zur Konkurrenz um L-Arginin als Ausgangsstoff beider Stoffwechselwege (Durante *et al.*, 2007). Obwohl die NOS einen wesentlich geringeren K_m -Wert für L-Arginin besitzt (2-20 μM) als die Arginase (2-20 mM) beeinflussen sich beide Enzyme gegenseitig, da die Arginase eine um den Faktor 1000 höhere Aktivität als die NOS zeigt (Wu & Morris, 1998). So führt eine erhöhte Arginase-Aktivität zur Verminderung der L-Arginin Konzentration für die NOS und damit zu einer Abnahme der endothelialen NO-Freisetzung. Zusätzlich werden noch eine durch Arginase ausgelöste erhöhte Sensitivität der NOS gegen ADMA und eine NOS-Entkopplung mit Bildung von Superoxidanionen diskutiert (Durante *et al.*, 2007). Die NOS-Entkopplung und die Bildung von Peroxynitrit aus NO und Superoxidanionen reduzieren die NO-Bioverfügbarkeit.

Gleichzeitig hemmt das Intermediat der NO-Synthese N^{ω} -Hydroxy-L-arginin die Arginase unter physiologischen Bedingungen (Boucher *et al.*, 1994).

1.2.5 Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)

Die Methylierung proteingebundener Aminosäuren wie L-Arginin stellt eine wichtige posttranslationale Modifikation mit regulatorischer Funktion dar (Zakrzewicz & Eickelberg, 2009). Damit werden unter anderem Protein-Protein-Interaktionen, die Transkription, Signaltransduktions-Vorgänge und Prozesse des Zellzyklus moduliert (Zakrzewicz & Eickelberg, 2009; Bedford & Clarke, 2009). Neben Stickstoff-, Sauerstoff und Schwefelatomen können auch Kohlenstoffatome methyliert werden (Krause *et al.*, 2007).

Die N^{ω} -Atome der Guanidinstruktur proteingebundener Arginine werden durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) methyliert (Bedford & Clarke, 2009). Dabei stellt *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) die benötigten Methylgruppen zur Verfügung. Eine direkte Methylierung freien L-Arginins wurde bisher nicht nachgewiesen (Krause *et al.*, 2007). Durch Peptidyl-Arginin-Deiminasen (EC 3.5.3.15) können die Methylgruppen am proteingebundenen Arginin zu L-Citrullin und Methylamin umgewandelt werden (Shirai *et al.*, 2001).

Seit der Entdeckung der ersten PRMT von Paik und Kim, wurden noch weitere PRMTs identifiziert (Paik & Kim, 1968; Krause *et al.*, 2007). Die PRMTs vom Typ I, II und IV katalysieren die Bildung von proteingebundenem N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA). Durch eine zusätzliche Methylierung am selben Stickstoff wird von PRMT I proteingebundenes, asymmetrisches $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA) gebildet (s. Abbildung 1.7). Eine zusätzliche Methylierung von L-NMMA durch PRMT II führt zu proteingebundenem, symmetrischem N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (SDMA). PRMTs vom Typ III katalysieren eine Monomethylierung am N^{δ} -Atom und wurden bisher nur in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen (Krause *et al.*, 2007). Durch proteolytischen Abbau der methylierten Proteine werden die Methylarginine L-NMMA, ADMA und SDMA freigesetzt und ihre physiologischen Plasmaspiegel erhöht (Zakrzewicz & Eickelberg, 2009). Da L-NMMA und ADMA die NOS inhibieren (MacAllister *et al.*, 1996), ist ihre Bildungsrate relevant für die Regulation des NO-Stoffwechsels.

1. Einleitung

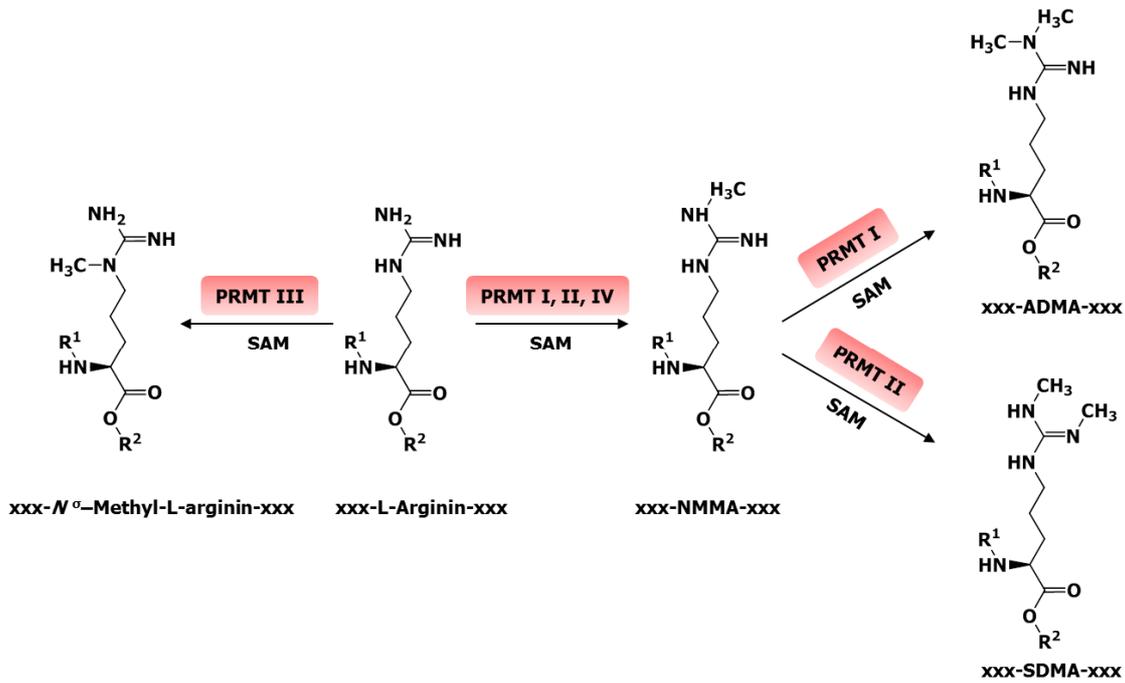


Abbildung 1.7: Schema der posttranslationalen Methylierung von L-Arginin durch PRMTs. (modifiziert nach Krause *et al.*, 2007)

ADMA: $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin. L-NMMA: N^{ω} -Monomethyl-L-arginin. PRMT: Protein-Arginin-Methyltransferasen. SAM: *S*-Adenosyl-L-methionin. SDMA: $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin.

1.2.6 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen

Im Jahr 1987 entdeckten Ogawa *et al.* ein weiteres Enzym, das eine wichtige Rolle bei der Regulation des NO-Stoffwechsels spielt (Ogawa *et al.*, 1987). Das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH; EC 3.5.3.18) katalysiert den hydrolytischen Abbau von N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) und $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA) zu L-Citrullin und Mono- bzw. Dimethylamin (s. Abbildung 1.8) (Ogawa *et al.*, 1987; Leiper *et al.*, 1999).

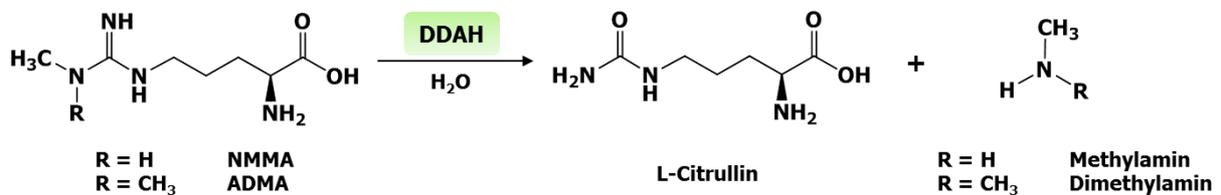


Abbildung 1.8: Umsetzung asymmetrisch methylierter Arginine durch DDAH.

ADMA: $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin. DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase. L-NMMA: N^{ω} -Monomethyl-L-arginin.

Bei den asymmetrisch methylierten Argininen handelt es sich um kompetitive, endogene NOS-Inhibitoren, deren Akkumulation die NO-Bildung blockiert (Anthony *et al.*, 2005). Damit wird die NO-Synthese indirekt über die DDAH-Aktivität reguliert. Von physiologischer Bedeutung als Inhibitor ist hauptsächlich das ADMA, dessen Plasmaspiegel ($< 1 \mu\text{M}$) ca. 10fach höher ist als der von L-NMMA (Vallance *et al.*, 1992).

Das ebenfalls endogen gebildete symmetrische $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (SDMA) stellt keinen NOS-Inhibitor dar und wird auch nicht durch die DDAH abgebaut (Leiper & Vallance, 1999). SDMA wird stattdessen renal eliminiert. Eine renale Elimination von L-NMMA und ADMA erfolgt nur zu ca. 10 % (Tran *et al.*, 2003). Für ADMA wird noch ein alternativer Abbau über die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT2; EC 2.6.1.44) beschrieben (Rodionov *et al.*, 2010).

Die DDAH wurde in Ratten entdeckt, ist aber inzwischen in zahlreichen Säugetieren beschrieben (Ogawa *et al.*, 1987; Kimoto *et al.*, 1998; Bogumil *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde das Enzym auch in einigen Prokaryoten wie *Pseudomonas aeruginosa* (paDDAH) nachgewiesen. Dort wurde eine Organisation der DDAH in einem Operon mit anderen Enzymen des Arginin-Stoffwechsels identifiziert und daraus eine Schlüsselrolle für mikrobielle DDAHs im Arginin-Stoffwechsel abgeleitet (Santa Maria *et al.*, 1999). In Hefen wurde bisher keine DDAH identifiziert. Da Hefen aber über die PRMT vom Typ III verfügen, wäre die Existenz einer DDAH in Hefen denkbar (Krause *et al.*, 2007).

Die bakterielle Isoform existiert als Homodimer, wobei sie auch als Monomer katalytisch aktiv ist (Plevin *et al.*, 2004). In Säugetieren existieren zwei Isoformen des Enzyms, die bisher nur als Monomere beschrieben wurden und auf verschiedenen Genen codiert sind (Wang *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2000). Die zweite Isoform der DDAH (DDAH-2) wurde 1999 von Leiper *et al.* im Menschen durch Analyse von DNA-Datenbanken mit der Sequenz der Ratten-DDAH identifiziert. (Leiper *et al.*, 1999) Er wies die DDAH-Aktivität durch Umsetzung von L-NMMA und ADMA an *E. coli*-Lysaten nach, die verstärkt rekombinant hergestellte humane DDAH-2 enthielten. Indirekte Daten aus Zellkulturstudien und der transgenen DDAH-2-Maus untermauern eine Korrelation der DDAH-Bildung und Aktivität mit Veränderungen in ADMA-Spiegeln (Achan *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2007; Garbin *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008;

1. Einleitung

Sakurada *et al.*, 2008). Allerdings konnte die Methylarginin-Umsetzung bis heute nicht an reiner DDAH-2 gezeigt werden.

Die Arbeitsgruppen von Leiper und Tran zeigten mit mRNA-Analysen fetaler und adulter Gewebe, dass die DDAH-Isoformen unterschiedliche Zellverteilungen aufweisen (Leiper *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2000). Die DDAH-1 kommt hauptsächlich im Gehirn, der Niere, der Leber und der Bauchspeicheldrüse vor, während die DDAH-2 im Herz, der Niere und der Placenta lokalisiert ist. Zusätzlich ergab die Analyse für DDAH-2 eine deutliche Reduktion der mRNA-Bildung in den meisten adulten Geweben, woraus eine entwicklungsabhängige Regulation der DDAH-2-Bildung geschlossen wurde (Tran *et al.*, 2000). Außerdem wurde auf diese Art eine Co-Lokalisation zwischen der DDAH-1 und der nNOS sowie der DDAH-2 und der eNOS gezeigt und eine Isoform-spezifische Regulation der NOS-Aktivität durch DDAH postuliert (Leiper *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2010).

Die Lokalisation der DDAH-Isoformen innerhalb von Zellen wird kontrovers diskutiert. Für beide Enzyme wird hauptsächlich eine cytosolische Lokalisation beschrieben, wobei sich vereinzelt Hinweise für eine Membranassoziation beider Enzyme finden (Tojo *et al.*, 1997; Birdsey *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Kürzlich wurde für DDAH-2 eine Translokation in Mitochondrien in Folge eines Interleukin 1 β -Stimulus beschrieben (Cillero-Pastor *et al.*, 2012).

Die beiden Isoformen der Säuger-DDAH weisen untereinander eine Sequenzidentität von ca. 50 % auf und zur paDDAH eine Sequenzidentität von 22 % (DDAH-2) bzw. 30 % (DDAH-1) (Frey *et al.*, 2006; Plevin *et al.*, 2004). Innerhalb der Spezies beträgt die Sequenzübereinstimmung bei den Säuger-DDAHs ca. 92 %.

Bei der Analyse der Kristallstruktur der paDDAH wurde im aktiven Zentrum eine Aminosäure-Triade aus Cystein, Histidin und Glutamat als entscheidend für die Umsetzung der Methylarginine identifiziert (Murray-Rust *et al.*, 2001). Da das Cystein essentiell für die hydrolytische Umsetzung ist, handelt es sich bei der DDAH um eine Cytsein-Hydrolase.

Diese katalytische Triade wurde auch in der Kristallstruktur der bovinen (Frey *et al.*, 2006) und humanen DDAH-1 (Leiper *et al.*, 2007) (s. Abbildung 1.9) nachgewiesen

und führte zur Einordnung der DDAHs in die Familie der Arginin-modifizierenden Enzyme (Shirai *et al.*, 2001).

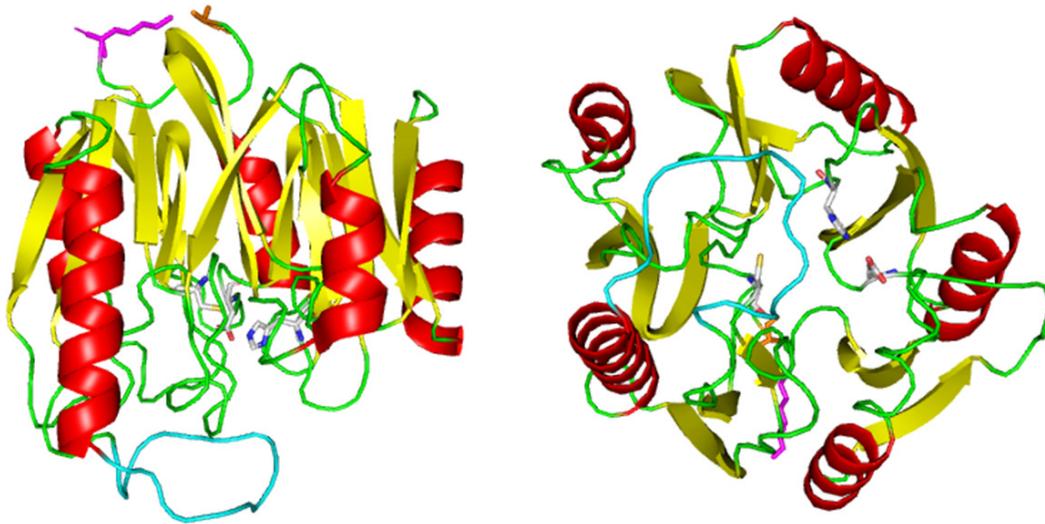


Abbildung 1.9: Kristallstruktur der humanen DDAH-1 (Protein-Daten-Bank: 3I2E).

Dargestellt ist die Struktur der hDDAH-1 modifiziert nach Wang, 2009 mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums. Links: Seitenansicht. Rechts: Aufsicht. Rot: α -Helices, Gelb: β -Faltblätter, Grün: *loops*, Türkis: *loop* der bei Substratbindung die Bindetasche verschließt, Magenta: C-Terminus, Orange: N-Terminus. Aminosäuren in schematischer "Stick"-Darstellung.

Die Analyse der Kristallstrukturen zeigt, dass bei den Säuger-DDAHs lediglich das Glutamat gegen Aspartat ausgetauscht ist (Frey *et al.*, 2006). Die Substratbindestellen weisen dagegen stärkere Variationen in der Aminosäuresequenz auf. Zusätzlich belegt die Strukturanalyse der Säuger-DDAH einen Propeller-artigen Aufbau aus fünf Elementen, der dem Aufbau anderer Arginin-modifizierenden Enzyme ähnelt (Leiper *et al.*, 2007). Der Kanal im Inneren des Enzyms wird mittig durch eine Salzbrücke geteilt. Die eine Seite des Kanals ist eine wassergefüllte Pore, auf der anderen Seite befindet sich das aktive Zentrum (Frey *et al.*, 2006).

Im aktiven Zentrum der Säuger-DDAH-1 befindet sich im inaktiven Zustand ein Zn^{2+} -Ion, das tetrahedral über die Schwefelatome zweier Cysteine und über zwei N/O-Atome im aktiven Zentrum gebunden ist (Bogumil *et al.*, 1998; Frey *et al.*, 2006). Das Zn^{2+} hemmt einerseits reversibel die Aktivität des Enzyms und schützt es andererseits vor einer Inaktivierung durch Hitze oder Nitrosylierung des Cysteins im aktiven Zentrum (Leiper *et al.*, 2002). Eine reversible Nitrosylierung der DDAH wurde bei erhöhter NO-Konzentration und durch *S*-Nitroso-homo-L-cystein nachgewiesen

1. Einleitung

(Knipp *et al.*, 2005). Dabei scheint die Nitrosylierung der DDAH, ebenso wie die kompetitive Hemmung der DDAH durch L-Arginin (Wang *et al.*, 2006), eine physiologische Regulation des NO-Stoffwechsels darzustellen.

Das Zn^{2+} -Ion wird bei der Anlagerung eines der asymmetrisch methylierten Arginine aus dem aktiven Zentrum verdrängt. Dabei interagiert das Leucin 29 aus einem *loop* (in Türkis dargestellt s. Abbildung 1.9) mit der Aminogruppe des Substrats und verschiebt das aktive Zentrum, um das Substrat dort zu halten (Frey *et al.*, 2006). Gleichzeitig erfolgt eine Deprotonierung des Cysteins im aktiven Zentrum mit Bildung eines Thiolats (s. Abbildung 1.10) (Stone *et al.*, 2005). Dieses greift daraufhin den Guanidiniumkohlenstoff des Substrats unter Ausbildung eines tetraedrischen Übergangszustandes nukleophil an (Murray-Rust *et al.*, 2001). Durch Abspaltung von Mono- bzw. Dimethylamin bildet sich ein stabiles Thiouronium Intermediat aus, das bei der nachfolgenden Hydrolyse L-Citrullin freisetzt. Die Spaltung des Übergangszustands und die Hydrolyse des Thiouroniums wird durch das Histidin im aktiven Zentrum vermittelt. Für keine der DDAHs wurde bisher ein Bedarf an Kofaktoren für die Umsetzung der Methylarginine beschrieben.

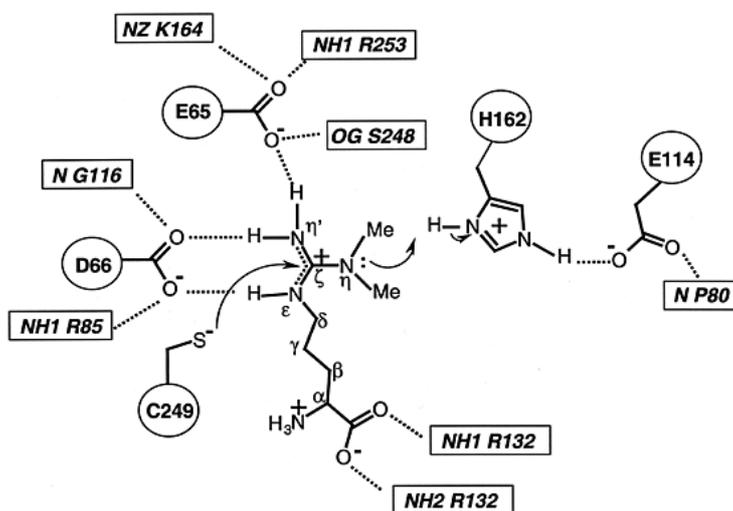


Abbildung 1.10: Mechanismus der paDDAH-Katalyse nach (Murray-Rust *et al.*, 2001).

Dargestellt ist der erste Schritt der DDAH-Katalyse mit dem Angriff des Thiolats am ADMA. Die Aminosäuren der Bindetasche sind mit dem Einbuchstaben-Code und der Zahl ihrer Lokalisation in der Struktur angegeben.

Für die DDAH-2 konnte bisher noch keine Kristallstruktur ermittelt werden. Aus den Daten von Homologie-Modellen wird für die DDAH-2 grundsätzlich ein ähnlicher Aufbau wie für die DDAH-1 vorhergesagt. Innerhalb der Bindetasche sollen aber größere Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung bestehen (Knipp, 2007).

Eine Untersuchung von nativ gereinigter und rekombinant in *E. coli*-hergestellter DDAH bestätigte die Umsetzung von L-NMMA nur für DDAH-1. Als mögliche Ursachen der fehlenden Aktivität der DDAH-2 werden sowohl die vorhergesagten Unterschiede in der Substratbindetasche als auch das Fehlen einer intrinsischen hydrolytischen Aktivität diskutiert. Die von Leiper postulierte DDAH-2-vermittelte Hydrolyse von L-NMMA und ADMA wird auf Grund dieser und weiterer Arbeiten kontrovers diskutiert (Wang *et al.*, 2007; Kotthaus, 2008; Pope *et al.*, 2009a). Daraus resultiert die aktuelle Frage über welchen Mechanismus die DDAH-2 den NO-Stoffwechsel beeinflusst.

Neben der Regulation des NO-Stoffwechsels sind auch NO-unabhängige Funktionen der DDAH beschrieben. Hasegawa *et al.*, beschrieben 2006 eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen der DDAH-2 und der Proteinkinase A (PKA, EC 2.7.11.11). Dadurch kommt es bei Überexpression der DDAH-2 zur Erhöhung der Konzentration des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Hasegawa *et al.*, 2006). Auch für die DDAH-1 ist eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem Neurofibromin 1 (NF-1) beschrieben (Tokuo *et al.*, 2001). Neurofibromin 1 ist ein negativer Regulator der Ras-Signalkaskade und wirkt als Tumorsupressor (Mullally & Ebert, 2010). Die physiologischen Effekte der Protein-Protein-Interaktion von DDAH-1 mit NF-1 sind bisher nicht geklärt.

1.3 Therapeutische Beeinflussung der NO-Konzentration

Aus den bisher geschilderten Effekten physiologischer und pathophysiologischer Stickstoffmonoxid-Konzentrationen ist die immense Bedeutung des Moleküls für die menschliche Gesundheit ersichtlich. Die Regulation des NO-Stoffwechsels (s. 1.2) bietet dabei vielfältige Ansatzmöglichkeiten, um bei Erkrankungen die erhöhten oder erniedrigten NO-Spiegel therapeutisch zu modulieren. Dabei liegt die Herausforderung in der Entwicklung zielgerichteter Agonisten oder Antagonisten für einzelne En-

1. Einleitung

zym-Isoformen und Krankheiten. Die pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten werden nachfolgend vorgestellt.

1.3.1 Therapeutische Ansätze zur Steigerung der NO-Konzentration

Eine Steigerung der NO-Konzentration kann auf vielen Wegen erreicht werden. Eine Möglichkeit ist die Gabe von NO-Donatoren, die enzymatisch oder nicht-enzymatisch NO freisetzen (Moncada *et al.*, 1991). Dadurch wird eine Erweiterung der Blut- und Herzkranzgefäße ausgelöst, die den Blutdruck senkt und so die Vorlast des Herzens erniedrigt. Man unterscheidet bei den sogenannten "Nitraten" organische Arzneistoffe wie Glyceroltrinitrat (Salpetersäureester) oder Molsidomin von anorganischen Verbindungen wie Nitroprussid-Natrium (s. Abbildung 1.11) (Schade *et al.*, 2010). Die Arzneistoffe werden zur Therapie von Bluthochdruckkrisen, bei chronischer Herzinsuffizienz, beim Herzinfarkt und bei Angina pectoris eingesetzt (Daiber *et al.*, 2008).

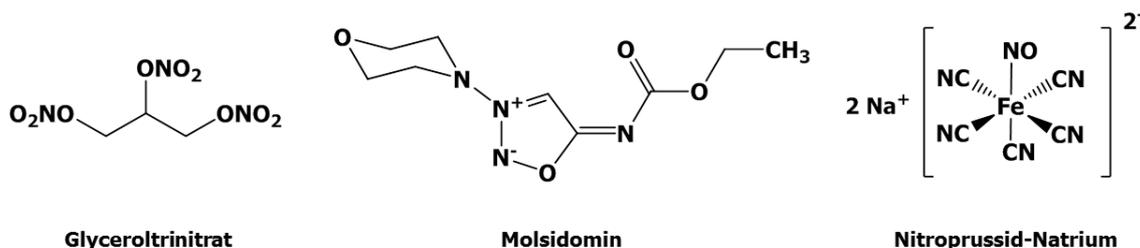


Abbildung 1.11: Beispiele für therapeutisch genutzte, organische und anorganische Nitrate.

Eine andere Möglichkeit die NO-Bildung zu steigern, liegt in der Supplementierung von L-Arginin, L-Citrullin, alternativen NOS-Substraten, NOHA bzw. Tetrahydrobiopterin. Eine gute Übersicht über die zu Grunde liegenden Studien liefern die Reviews von Stuehr, 2004, Böger & Ron, 2005 und Hoang *et al.*, 2013.

Die Supplementierung von L-Arginin zeigt positive Effekte bei endothelialer Dysfunktion, Herzinfarkt, Angina pectoris, Diabetes und erektiler Dysfunktion. Das Problem am oral zugeführten L-Arginin ist seine kurze Halbwertszeit von weniger als einer Stunde im Plasma (Bode-Böger *et al.*, 1998). So zeigte sich in klinischen Studien, dass für eine ausreichende Gefäßrelaxation entweder hohe Mengen der Substanz zugeführt oder Formulierungen mit verzögerter Freisetzung gewählt werden müssen (Böger & Ron, 2005). Das Problem der kurzen Halbwertszeit kann durch eine *in vivo*

Generierung von L-Arginin aus supplementiertem L-Citrullin gelöst werden. Dieser Weg zur indirekten L-Arginin-Supplementierung wird von einigen Wissenschaftlern favorisiert, weil es nicht zur gesteigerten Harnstoff-Bildung durch Arginase kommt (Hallemeesch *et al.*, 2002; Hoang *et al.*, 2013; Curis *et al.*, 2005). Allerdings wird die Verwendung von L-Arginin auch kritisch bewertet, da eine Studie zur Supplementierung von L-Arginin beim akuten Myokardinfarkt wegen erhöhter Mortalität in der L-Arginin-Gruppe abgebrochen werden musste (Schulman *et al.*, 2006). Zusätzlich wird die starke Harnstoff-Bildung bei L-Arginin-Gabe als klinisch bedenklich eingestuft (Curis *et al.*, 2005).

Neben der Supplementierung von L-Arginin zur NO-Synthese können auch alternative NOS-Substrate verwendet werden. Bei diesen handelt es sich meist um Substratanaloga des Arginins mit Guanidin- oder Hydroxyguanidinstruktur, aber auch um Verbindungen ohne α -Amino- und Carboxylgruppe. Da jedoch die Affinität der NOS-Enzyme zu den alternativen Substraten verringert ist, stellen sie derzeit keine echten Alternativen zu L-Arginin dar (Stuehr, 2004).

Die Supplementierung von Tetrahydrobiopterin (BH₄) wird differenziert bewertet. Da BH₄ einen wichtigen allosterischen Aktivator und Redox-Cofaktor der NOS darstellt, ist eine ausreichende Versorgung mit BH₄ essentiell für eine funktionierende NO-Synthese und die Verhinderung der NOS-Entkopplung (s. 1.2.3) (Crabtree & Channon, 2011; Schade *et al.*, 2010). So ergab eine Studie mit BH₄-Supplementierung eine Verbesserung der Gefäßfunktion bei Diabetes (Heitzer *et al.*, 2000). Andere klinische Studien konnten keine Verbesserung der Gefäßrelaxation oder der NOS-Entkopplung bei zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen unter BH₄-Therapie feststellen (Hoang *et al.*, 2013). Das wurde darauf zurückgeführt, dass die orale BH₄-Zufuhr parallel zum BH₄-Plasmaspiegel auch den Spiegel von Dihydrobiopterin (BH₂) erhöht, das einen kompetitiven Inhibitor der eNOS darstellt. Die Effektivität einer BH₄-Therapie muss daher erst noch in künftigen Studien geprüft werden.

Die Erhöhung der endogenen NO-Konzentration in Folge einer gesteigerten Verfügbarkeit von L-Arginin kann auch über eine Hemmung der Arginase erfolgen (s. 1.2.4). Als Inhibitoren der Arginase existieren derzeit hauptsächlich zwei Gruppen:

1. Einleitung

Boronsäure-Derivate und L-Arginin-Analoga (s. Abbildung 1.12). Die Boronsäure-Derivate *S*-2-Amino-6-boronhexansäure (ABH) und *S*-(2-Boronethyl)-L-cystein (BEC) sind potente, kompetitive und spezifische Arginase-Inhibitoren (Ash, 2004). Die L-Arginin-Analoga *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA), *nor*-NOHA und *N*^ω-Hydroxy-*N*^σ-Methyl-L-arginin (NHAM) sind weniger spezifische Hemmstoffe der Arginase (Steppan *et al.*, 2013; Lunk, 2012).

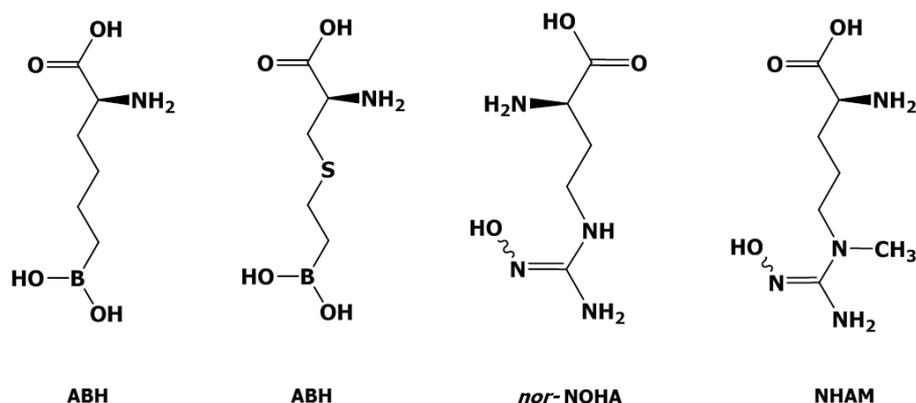


Abbildung 1.12: Beispiele für Arginase-Hemmstoffe.

Der Einsatz von BEC und *nor*-NOHA führte bei hypertensiven Patienten durch die Arginase-Hemmung zu einer verstärkten Vasodilatation und einer signifikanten Verbesserung der Erkrankung (Holowatz & Kenney, 2007). Studien mit ABH an Meerschweinchen zeigten eine drastische Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität, Entzündung und Obstruktion bei Asthma. Aus diesem Grund wird eine Hemmung der Arginase bei Erkrankungen mit erhöhter Arginaseaktivität wie endothelialer Dysfunktion, Asthma, Krebs und Diabetes diskutiert (Durante *et al.*, 2007; Maarsingh *et al.*, 2008; Straus *et al.*, 1992; Bagi *et al.*, 2013).

Die Aktivierung der DDAH oder die Steigerung der Enzymmenge stellt ein interessantes Angriffsziel für die Steigerung der NO-Synthese via Reduktion der physiologischen ADMA-Spiegel dar. Das ist relevant bei Erkrankungen wie Bluthochdruck, Herzinsuffizienz, erektiler Dysfunktion und Atherosklerose (Böger, 2004; Zoccali, 2007; Park *et al.*, 2009; Miyazaki *et al.*, 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Entdeckung erster direkter Assoziationen zwischen DDAH-Polymorphismen und kardiovaskulären Erkrankungen (Valkonen *et al.*, 2005; Gad *et al.*, 2011).

Erste Verbesserungen wurden bei der endothelialen Dysfunktion mit einem *ex vivo* Gentransfer der DDAH-2 an atherosklerotischen Kaninchen-Aorten erzielt (Feng *et al.*, 2010). Bereits zuvor wurde in transgenen Mäusen, die vermehrt DDAH-1 bilden, eine Halbierung der ADMA-Plasmaspiegel, eine annähernde Verdopplung der NO-Bildung und ein Absinken des Blutdrucks nachgewiesen (Dayoub *et al.*, 2003). Bisher sind Methoden zur Überexpression oder zum Gentransfer einer DDAH für die Anwendung bei kardiovaskulären Erkrankungen aber noch im tierexperimentellen Stadium.

Die Aktivität der DDAH wird durch oxidativen Stress reduziert (Palm *et al.*, 2007), so dass ein Schutz davor eine Möglichkeit darstellt, die DDAH-Aktivität zu erhalten.

Achan *et al.* zeigten 2002, dass *all-trans*-Retinolsäure die DDAH-2 Transkription und die NO-Bildung in einer Maus-Endothelzellkultur steigert, ohne dass die eNOS-Transkription stieg. Der Effekt könnte laut den Autoren auf einer Aktivierung der PPAR/RXR-Bindestelle in der Promotorregion der DDAH-2 durch *all-trans*-Retinolsäure beruhen. Eine Aktivierung dieser Bindestelle wurde in den Nieren von Ratten durch den Arzneistoff Pioglitazon beobachtet (Wakino *et al.*, 2005). Da nur die Transkription der DDAH-Isoform 2 gesteigert wurde, führten die Autoren die Absenkung der Plasma-ADMA-Spiegel und des Blutdrucks sowie die Steigerung der NO-Bildung auf die vermehrte DDAH-2-Bildung zurück. Die Untersuchung des Effekts von Nebivolol auf eine humane Endothelzellkultur mit und ohne Blockade der DDAH-2 durch *small-interfering* RNA (siRNA) lieferte ähnliche Effekte (Garbin *et al.*, 2007).

Für die DDAH-1 konnte eine Transkriptionssteigerung durch IL-1 β in Kulturen glatter Gefäßmuskulzellen beobachtet werden (Ueda *et al.*, 2003). Darüber hinaus werden die Transkription der DDAH-1 und der ADMA-Metabolismus in Ratten durch Farneosid-X-Rezeptor (FXR)-Agonisten gesteigert, die die FXR-Bindestelle in der Promotorregion des Enzyms ansteuern können (Hu *et al.*, 2006; Ghebremariam *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde keine gesteigerte Transkription der DDAH-2, trotz Existenz einer FXR-Bindestelle in der Promotorregion des Proteins, beobachtet (Hu *et al.*, 2006). Die therapeutische Einsatzmöglichkeit der zuvor beschriebenen Substanzen bei NO-defizienten Krankheitsbildern werteten die Autoren als kritisch. Als Gründe dafür nannten Sie, die in den Studien verwendeten, unphysiologisch ho-

1. Einleitung

hen Dosen der Substanzen und stellten die Übertragbarkeit der Daten von Tier- und Zellkulturstudien auf den Menschen in Frage. Außerdem existieren die angesteuerten Bindestellen noch in den Promotorregionen anderer Genen, so dass eine selektive Steuerung der DDAH-Isoformen auf diesem Wege wohl kaum realisiert werden kann. Die Identifizierung kleiner chemischer Moleküle als allosterische Aktivatoren der DDAH wurde von Ghebremariam *et al.* in einem *high throughput screening* (HTS) durchgeführt (Ghebremariam *et al.*, 2012). Im HTS wurde eine kleine Zahl an potentiellen Aktivatoren gefundenen, die allerdings zurzeit noch nicht weiter charakterisiert und publiziert sind.

Bei allen Überlegungen zur Aktivierung der DDAH sollten die NO-unabhängigen Regulationsfunktionen der DDAH nicht vergessen werden, die ebenfalls bis hin zu negativen Effekten beeinflusst werden könnten.

1.3.2 Therapeutische Ansätze zur Verminderung der NO-Konzentration

Die Hemmung einer übermäßigen NO-Freisetzung ist relevant beim septischen Schock, Diabetes, Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Thiemermann, 1997; Babu & Griffith, 1998a; Duncan & Heales, 2005).

Eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen besteht in der direkten Hemmung der NO-Synthese durch Inhibierung der NOS-Enzyme. Dabei ist es absolut wichtig, dass selektiv nur die iNOS (z.B. septischer Schock) und die nNOS (z.B. Migräne) gehemmt werden, um die wichtige regulatorische Wirkung der eNOS auf die Gefäße und das Blut zu erhalten. Dabei stellt die hohe Konservierung des aktiven Zentrums der NOS-Isoformen ein großes Problem bei der Entwicklung Isoformen-selektiver NOS-Inhibitoren dar (Alderton *et al.*, 2001). Zusätzlich sollte die Selektivität gegenüber anderen L-Arginin-metabolisierenden Enzymen bedacht werden.

Bei den NOS-Hemmstoffen werden verschiedene strukturelle Gruppen unterschieden (Babu & Griffith, 1998a): Aminosäure-Analoga (z.B. *N*^ω-Amino-L-arginin; *N*^δ-(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-NIO)), Guanidine (z.B. Aminoguanidin), Amidine (z.B. 1400W), Isothioharnstoffe (z.B. *S*-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC)), Indazole, Imidazole und Tetrahydrobiopterin-Analoga (s. Abbildung 1.13).

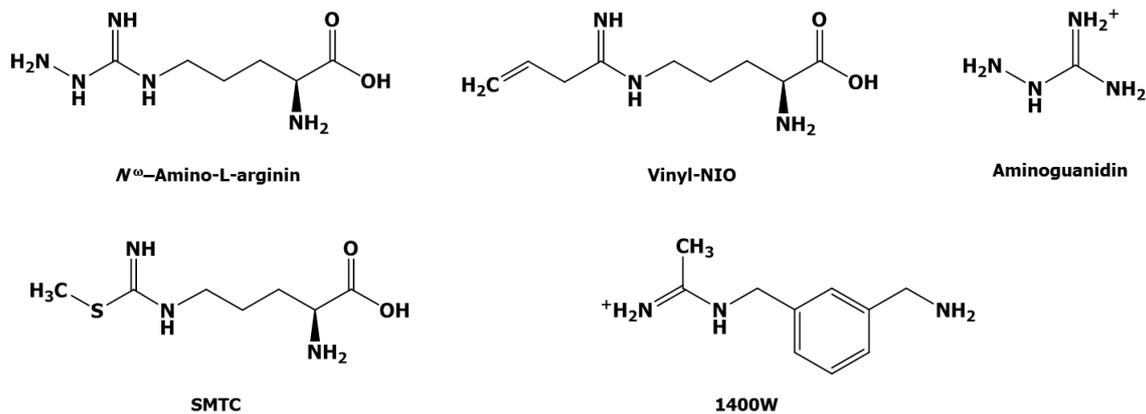


Abbildung 1.13: Beispiele für NOS-Hemmstoffe.

Eine weitere Einteilung der Inhibitoren ist nach ihrem Angriffsziel an der NOS und ihrer Hemmwirkung (reversibel/irreversibel) möglich (Knowles & Moncada, 1994).

So zählen z.B. die endogenen NOS-Inhibitoren L-NMMA und ADMA zu den Aminosäure-Analoga, die mit L-Arginin um die Bindungsstelle an der Oxygenasedomäne konkurrieren und alle NOSs unspezifisch und reversibel hemmen.

Alle bis heute entwickelten NOS-Hemmstoffe konnten entweder wegen mangelnder Selektivität, Nebenwirkungen an anderen Rezeptoren und Enzymen oder ungünstiger Pharmakokinetik nicht zur Therapie eingesetzt werden. (Knowles & Moncada, 1994; Alderton *et al.*, 2001)

In einer doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie führte eine intravenöse Injektion von ADMA zum Absinken der Herzfrequenz, einer Verminderung der Auswurfleistung des Herzens und einem Anstieg des Blutdrucks (Achan *et al.*, 2003). Diese Effekte beruhen nachweislich auf der Hemmung der NOSs durch ADMA (Leiper & Vallance, 1999). Eine Blockade der DDAH führt durch die Akkumulation von NMMA und ADMA somit indirekt zu einer Hemmung der NO-Synthese. Aus diesem Grund rückt die DDAH in den Fokus der Forschung und Entwicklung neuer Therapieansätze für Krankheiten wie Sepsis und Alzheimer (Leiper & Vallance, 1999; Caplin & Leiper, 2012). Auf Grund der zuvor beschriebenen Co-Lokalisation der DDAH-2 mit der protektiv wirkenden eNOS, darf jedoch nur die DDAH-1 gehemmt werden (Leiper *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wird die Entwicklung selektiver, potenter DDAH-1-Inhibitoren fokussiert.

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Substanzklassen für DDAH-Inhibitoren beschrieben, die mangels reiner DDAH-2 bisher nur an der paDDAH oder der Säuger-DDAH-1 getestet wurden (s. Abbildung 1.14). Derivate des 2-Chloracetamidins und Pentafluorphenylsulfonate waren die ersten unselektiven DDAH-Hemmstoffe (Vallance *et al.*, 2005). Die Pentafluorphenylsulfonate hemmen neben der paDDAH auch noch die bakterielle Arginin-Deiminase (EC 3.5.3.6)

Viele DDAH-Hemmstoffe sind kompetitive Hemmstoffe, die auf der L-NMMA-Struktur basieren. Der potenteste Hemmstoff der Säuger-DDAH aus dieser Klasse ist N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257) mit einem K_i -Wert von $13 \pm 2 \mu\text{M}$ (Rossiter *et al.*, 2005). Die Infusion von L-291, einem Methylester des L-257, führte in Mäusen zur Erhöhung der Plasma-ADMA-Spiegel. Bei septischen Ratten stabilisierte die L-291-Infusion den Blutdruck (Leiper *et al.*, 2007). Diese Stoffe hemmen auch die NOS und die Arginase nur noch geringfügig (Kotthaus *et al.*, 2011a).

Eine weitere Stoffklasse wurde auf der Röntgenkristallstruktur der paDDAH entwickelt. Die Derivate der Indolthiobarbitursäure mit SR445 als potentestem Vertreter, hemmen zwar die paDDAH, nicht aber die hDDAH-1 (Hartzoulakis *et al.*, 2007; Kotthaus, 2008).

In unserem Arbeitskreis wurden an Hand dieser Daten gezielt Inhibitoren auf Guanidin- und Amidin-Basis entwickelt und an der hDDAH-1 getestet. Dabei wurde interessanterweise das als NOS-Inhibitor entwickelte N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-NIO) (Babu & Griffith, 1998b) als potentester Inhibitor der humanen DDAH-1 ($K_i = 2 \pm 1 \mu\text{M}$) identifiziert. Gleichzeitig gelang durch Decarboxylierung des L-257 die Entwicklung von N -(4-Aminobutyl)- N^{ω} -(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG), das überraschenderweise eine vergleichbare Hemmpotenz wie L-257 aufweist ($K_i = 18 \pm 6 \mu\text{M}$) (Kotthaus *et al.*, 2008; Kotthaus, 2008). Zusätzlich ist das AbMEG bezüglich der Selektivität gegenüber der NOS und der Arginase noch verbessert (Kotthaus, 2008). Es wurde in diesen Arbeiten auch postuliert, dass eine Verlängerung der Alkenylkette die Hemmpotenz und die Selektivität der Inhibitoren für die DDAH gegenüber der NOS steigern könnte.

Weiterentwickelte Alkylamidine stellen je nach Kettenlänge des Substituenten entweder spezifische Inhibitoren der nNOS oder der DDAH oder duale Inhibitoren beider

Enzyme dar (Wang *et al.*, 2009). Der Vorteil der dualen Inhibitoren sollte in einer effektiveren Hemmung der NO-Bildung z.B. bei der Krebstherapie liegen.

Mit Hilfe von *high throughput screenings* (HTS) wurden 4-Halopyridine und Ebselen in jüngster Zeit als DDAH-Inhibitoren identifiziert (Johnson *et al.*, 2011a; Linsky *et al.*, 2011). Die 4-Halopyridine wie z.B. das 4-Brom-2-Methylpyrimidin sind kovalente, irreversible DDAH-Inhibitoren. Sie binden am Cystein249 des aktiven Zentrums der pDDAH. Durch den Angriff des Cysteins wird das Halogenid aus dem Inhibitor entfernt und dauerhaft eine positive Ladung am Stickstoff induziert. In gelöster Form liegen die 4-Halopyridine in geringer Menge auch protoniert vor (Johnson *et al.*, 2011b). Diese Spezies wird über Aspartat66 im aktiven Zentrum gebunden. Da die Affinität der Inhibitoren zur DDAH allerdings nur gering ist, dienen sie eher als Leitstruktur für die Entwicklung potenter Hemmstoffe.

Ebselen zeigt ein ähnliches Verhalten. Es wirkt auch als sehr potenter, kovalenter DDAH-Inhibitor, der bei Bindung am Enzym strukturell verändert wird. Der Selenazolring des Ebselen reagiert irreversibel mit dem Cystein249, wodurch eine Selenulfid-Bindung gebildet wird. Allerdings hemmt die Substanz neben der DDAH noch eine Vielzahl anderer Enzyme (z.B. Lipoxygenase und Proteinkinase C). Diese Polypharmakologie wird jedoch als vielversprechend angesehen, so dass sich die Substanz in Phase-III der Klinischen Studie für die Indikation "akuter, ischämischer Schlaganfall" befindet (Linsky *et al.*, 2011).

1. Einleitung

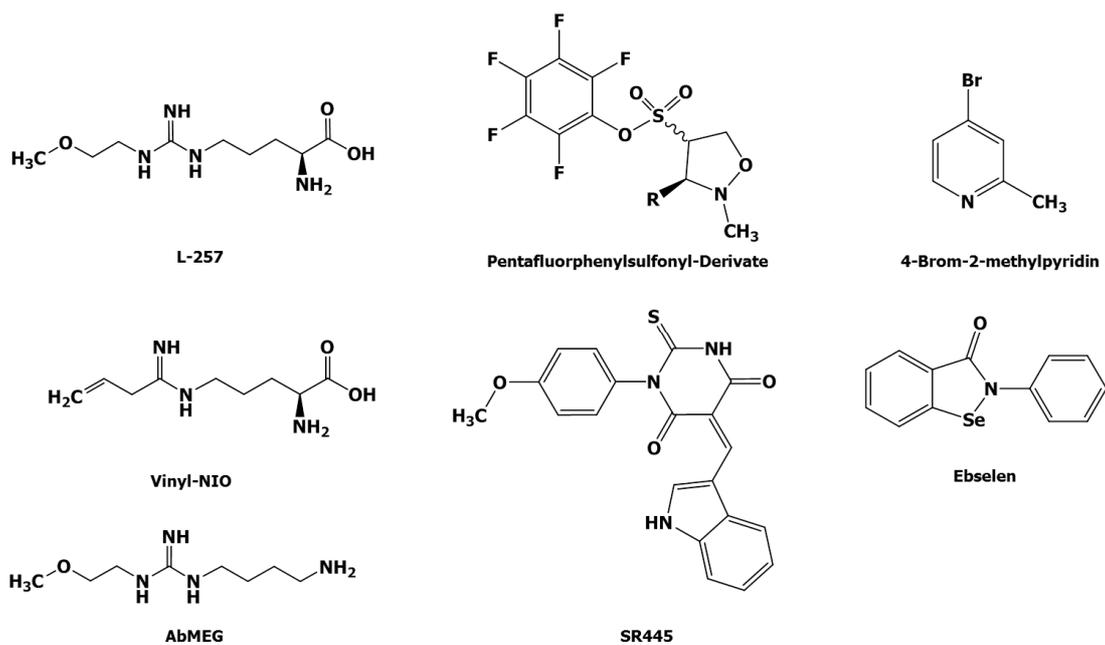


Abbildung 1.14: Ausgewählte DDAH-Hemmstoffe (getestet an paDDAH und Säuger-DDAH-1).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.1 Einleitung

2.1.1 Rekombinante Herstellung der humanen DDAH

Um ein Protein biochemisch charakterisieren zu können, sind große Mengen des Proteins nötig. Deshalb isolierten Ogawa *et al.* die DDAH aus der Niere von Ratten, später als DDAH-1 (Leiper *et al.*, 1999) bezeichnet, mit klassischen Methoden der Proteinreinigung. Nach Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustauschchromatographie, hydrophober Interaktionschromatographie, Dialyse und Größenausschlusschromatographie erhielten sie hochreines Protein (Ogawa *et al.*, 1989). Mit diesem aufwändigen Verfahren wurde die DDAH-1 auch von anderen erfolgreich in hoher Reinheit gewonnen (Fundel *et al.*, 1996; Bogumil *et al.*, 1998; Kimoto *et al.*, 1998). Dabei wurde der massive Aufwand für die Reinigung mit der hohen Ausbeute von ca. 1-3 mg hochreiner DDAH-1/100 mg Gewebe z.B. für die Erstellung von Kristallstrukturen (s. Abbildung 2.1) gerechtfertigt (Knipp *et al.*, 2001).

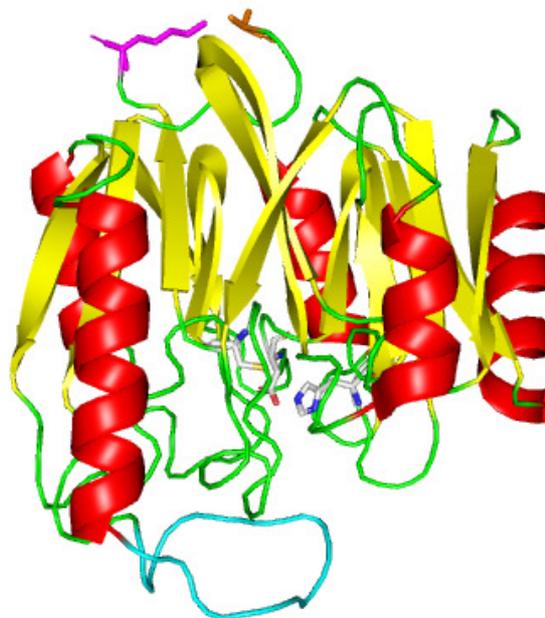


Abbildung 2.1: Kristallstruktur der humanen DDAH-1 (Protein-Daten-Bank: 3I2E).

Dargestellt ist die Struktur der hDDAH-1 mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums (www.rcsb.org). Rot: α -Helices, Gelb: β -Faltblätter, Grün: *loops*, Türkis: *loop* der bei Substratbindung die Bindetasche verschließt, Magenta: C-Terminus, Orange: N-Terminus. Aminosäuren in schematischer "Stick"-Darstellung.

Parallel zur Reinigung des nativen Enzyms gab es schon früh Versuche die DDAH-1-DNA mit speziellen DNA-Sequenzen, sogenannten *tags*, zu fusionieren und gentechnologisch in Mikroorganismen herzustellen. Die *tags* dienten dazu die DDAH-1 nach der Herstellung leichter reinigen zu können. Das Enzym sollte so schneller und mit geringerem Aufwand einer biochemischen Charakterisierung zugänglich gemacht werden.

Als erste führten Kimoto *et al.*, 1998 Versuche zur Herstellung einer rekombinanten DDAH-1 durch. Die Gruppe versuchte DDAH-1 als Fusionsprotein an Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt in *E. coli* herzustellen und per Affinitätschromatographie zu reinigen. Auf Grund der massiven Bildung unlöslicher DDAH-1 in *inclusion bodies*, lieferte der Versuch nur geringe Ausbeuten von ca. 0,5 mg hochreiner DDAH-1/1 Liter Bakterienkultur. Dies wurde von Knipp als deutlich zu wenig für eine umfassende Charakterisierung des Enzyms kritisiert. Er entwickelte deshalb eine Methode, mit der beide DDAH-Enzyme aus Leber und Nieren von Rind und Schwein im Lauf einer Gelfiltration mit ausreichender Reinheit voneinander getrennt werden konnten (Knipp *et al.*, 2001; Knipp, 2007).

Dennoch gab es weitere Bestrebungen, die rekombinante Proteinherstellung und Reinigung für DDAH-1 zu optimieren, um größere Mengen hochreinen Proteins für Studien zu gewinnen (Leiper *et al.*, 2007; Kotthaus *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Dabei gelang es in unserer Arbeitsgruppe kürzlich eine Methode zu etablieren, mit der hochreine DDAH-1 in hohen Ausbeuten von 5 mg/1 Liter *E. coli*-Kultur gewonnen wurde (Litty).

Für die DDAH-2 gab es bisher nur eine Publikation von Leiper *et al.*, die eine rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2 als His-getaggetes Fusionsprotein in *E. coli* beschreibt (Leiper *et al.*, 1999). Obwohl das Protein in dieser Arbeit über den His-*tag* einer Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni²⁺-NTA) zur Verfügung stand, gab es bis zu Beginn dieser Arbeit keine Publikation über die DDAH-2-Reinigung.

Versuche unseres Arbeitskreises hDDAH-2 rekombinant mit einem His-*tag* in ähnlicher Form wie von Leiper durchgeführt herzustellen, scheiterten bislang (Kotthaus, 2008). Auch die Verwendung verschiedener Wirtssysteme für die Herstellung des

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Proteins oder Modifikationen der rekombinanten DDAH-2-DNA führten nicht zum Erfolg (Altmann, 2009). Entweder konnte gar keine Proteinbildung mittels Western Blot detektiert werden oder das gebildete Protein wurde nur in Form unlöslicher Proteinaggregate, den *inclusion bodies*, detektiert. Eine Reinigung des Proteins und Studien zur DDAH-2-Aktivität bzw. zur Wirkung von DDAH-Inhibitoren waren so nicht möglich. Allerdings gelang die rekombinante Herstellung humaner DDAH-2 bisher auch keiner anderen Forschergruppe, so dass von generellen Problemen bei der gentechnologischen Herstellung dieses Proteins ausgegangen werden kann (Knipp, 2007; Walter Fast, Texas, Persönliche Kommunikation).

2.1.2 Zielsetzung der Arbeit

Da bislang im Arbeitskreis nur die rekombinante Herstellung und Aufreinigung von humaner DDAH-1 in *E. coli* möglich war, lag das erste Ziel dieser Arbeit in der Etablierung einer Methode zur rekombinanten Herstellung der hDDAH-2 (Kotthaus, 2008). Außerdem sollte, in Anlehnung an die guten Ergebnisse bei der DDAH-1-Reinigung, eine Affinitätschromatographie mit dem Fusions-*tag* zur Reinigung der DDAH-2 entwickelt werden.

Mit gereinigtem Protein sollten dann in Aktivitätsstudien die Umsetzung der Methylarginine L-NMMA und ADMA getestet werden, um die Aktivität des Enzyms und somit seine korrekte Herstellung zu belegen. Darüber hinaus waren vergleichende Studien zur Hemmwirkung von DDAH-Inhibitoren auf die humanen, rekombinant hergestellten Enzyme geplant, um Aussagen über die Isoformen-Selektivität der Hemmstoffe zu erhalten.

2.2 Materialien und Geräte

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte findet sich in Kapitel 5 dieser Arbeit.

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im Miniprep Ansatz wurden 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum versetzt und einem Klon oder der Dauerkultur angeimpft. Nach Übernachtinkubation der Kultur bei 37 °C erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mit dem *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System*. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde auf den Zusatz von alkalischer Protease verzichtet und die Plasmid-DNA mit 30-50 µl *Aqua bidest.* nach 5 min Inkubationszeit der Matrix eluiert.

Zur Isolierung größerer Mengen DNA wurde mit dem *Nucleo Bond[®] PC 500 Kit* im Maxiprep Ansatz gearbeitet. Dafür wurden *E. coli* Inkubationsansätze zwischen 100-300 ml bei 37 °C über Nacht inkubiert und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in ca. 500 µl *Aqua bidest.* rehydratisiert, die DNA-Konzentration bestimmt (s. 2.3.1.2) und bei 4 °C gelagert.

2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über folgende Formel:

$$c = A_{260\text{nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung} (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

$$f = 0,02 \text{ für Oligonukleotide und Einzelstrang-DNA}$$

$$f = 0,04 \text{ für Plasmide und Doppelstrang-DNA}$$

Über eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm wurde auf Verunreinigung durch Proteine getestet und die Reinheit der DNA aus dem Verhältnis $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

bestimmt. Für eine ausreichend reine DNA-Präparation liegt das Verhältnis $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ über 1,8.

Eine Abschätzung der DNA-Menge in einem Agarosegel konnte über einen Intensitätsvergleich mit den Banden des Markers durchgeführt werden.

2.3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation ausgewählter DNA-Teilbereiche und zur Einführung von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen für verschiedene Klonierungen wurde eine Polymerasekettenreaktion mit spezifischen PCR-Primern durchgeführt.

Dazu wurden 50-100 ng Plasmid-DNA als *template* mit 5 μl 10fach PCR-Puffer, dNTP-Mix (je 10 pmol), je 20 pmol PCR-Primer und 2 U DNA-Polymerase (One *Taq*[®]- oder *PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase) in einem PCR-*tube* versetzt und mit *Aqua bidest.* auf 50 μl aufgefüllt. Ein Ansatz ohne DNA diente als Negativkontrolle auf Verunreinigung der Reagenzien.

Für die Amplifikation mittels PCR im Thermocycler wurde das Temperaturprogramm auf die Länge des *templates* und die verwendeten PCR-Primer abgestimmt (s. Tabelle 2.1).

	T (°C)	Zeit (sec)
Denaturierung	94	180
30 Zyklen		
Denaturierung	94	30
Annealing	T_m	40
Extension	72	60-120
Extension	72	600
Lagerung	4	∞

Tabelle 2.1: PCR-Temperaturprogramm der Standard-PCR.

	T (°C)	Zeit (sec)
Denaturierung	94	180
je 2 Zyklen		
Denaturierung	94	30
Annealing	T _m , nach je 2 Zyklen – 2 °C	40
Extension	72	120
26 Zyklen		
Denaturierung	94	30
Annealing	51	40
Extension	72	120
Extension	72	600
Lagerung	4	∞

Tabelle 2.2: PCR-Temperaturprogramm der *touch-down* PCR für hDDAH-1.

Die Anlagerungstemperatur wurde näherungsweise über die Schmelztemperatur der Primer mit der Formel:

$$T_m = 60 + (0,41 \cdot GC) - 600/n$$

GC = Guanin und Cytosin-Anteil in %

n = Basenzahl des Primers

ermittelt und bei unterschiedlichen Werten der Primer der geringere Temperaturwert als Anlagerungstemperatur gewählt.

Die Extensionszeit t_{ex} (in s) betrug mindestens 60 s und wurde nach der folgenden Formel ermittelt:

$$t_{ex} = 0,06 \cdot \text{Länge des Produktes (bp)}$$

Das Enzym *DpnI* schneidet nur methylierte DNA und ermöglicht somit einen Abbau der *template*-DNA nach der PCR. Dazu wurden 44 µl des PCR-Ansatzes mit 10 U *DpnI* (10 U/µl) und 5 µl 10fach Tango-Puffer bei 37 °C für mindestens 6 h oder über Nacht inkubiert. Danach erfolgte eine Reinigung des Ansatzes mit dem *Hi Yield® PCR Clean-*

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Up & Gel-Extraction Kit (s. 2.3.1.6) und die Überprüfung per Agarosegelelektrophorese (s. 2.3.1.5) auf Reinheit.

2.3.1.4 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Beim Restriktionsverdau wurden 0,5-2 µg DNA mit 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA in einem geeigneten Puffer nach Angaben des Herstellers bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 2-3 h inkubiert. Bei Temperatur- oder Pufferinkompatibilitäten zwischen zwei Restriktionsenzymen wurde in mehreren Schritten verdaut. Der Verdau wurde mit der Agarosegelelektrophorese (s. 2.3.1.5) überprüft, indem die Größe der gebildeten Fragmente mit den entsprechenden Banden des Markers verglichen wurden.

2.3.1.5 Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese

Die Methode dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe und ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung und Reinheitsprüfung selbiger. Die Herstellung des für die Versuche verwendeten, 1 %igen Agarosegels erfolgte durch Suspension von 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer. Die Suspension wurde in der Mikrowelle für ca. 2 min erwärmt und gelöst, verdunstetes Wasser wurde ergänzt. Der Lösung wurde beim Abkühlen 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, bevor sie in ein Geltablett ausgegossen wurde. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 ihres Volumen an 10fach Ladepuffer versetzt, anschließend aufs Gel aufgetragen und bei 115 V über 20-30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker für die Größenbestimmung wurde *Pst*I geschnittene λ-DNA verwendet (s. Abbildung 2.2). Detektiert wurde unter UV-Licht bei 366 nm.

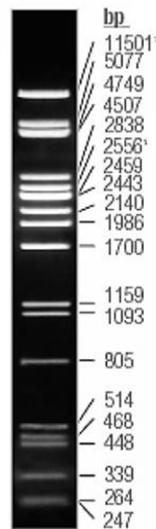


Abbildung 2.2: PstI-verdaute λ -DNA als Größenmarker für die Agarosegelelektrophorese.

2.3.1.6 Aufreinigung von DNA

Die Reinigung von DNA erfolgte immer mit dem *Hi Yield[®] PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* entweder nach einem Protokoll für die Aufreinigung von DNA aus dem Gel oder für die Aufreinigung von PCR-Produkten. Zur Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente zuvor unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die direkte Aufreinigung von DNA wurde bei Restriktionsverdauen von Plasmiden, *inserts* oder verdauten PCR-Produkten eingesetzt. Die Protokolle des Herstellers wurden dazu wie folgt modifiziert: die Matrix wurde im ersten Schritt der Reinigung für eine bessere DNA-Bindung ca. 1 min mit dem geladenen Verdau-Ansatz inkubiert. Außerdem wurden zur Erhöhung der Ausbeute alle Ansätze eines Verdau für die Reinigung auf eine Säule geladen. Zur Elution der DNA wurde die Matrix mit 28 μ l *Aqua bidest.* für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.1.7 Glätten von überhängenden DNA-Enden (*Blunting*)

Um glatte (*blunt*) DNA-Enden zu erhalten, wurde die DNA nach dem Restriktionsverdau mit T₄-DNA-Polymerase behandelt, die auf Grund ihrer 3'→5' Exonucleaseaktivität überhängende DNA-Basen eliminiert. Dazu wurden 5 U T₄-DNA-Polymerase in entsprechendem Puffer mit dNTP-Mix (je 5 pmol) versetzt und mit dem Ansatz des Restriktionsverdau auf 30 μ l aufgefüllt. Nach Inkubation bei 37 °C für 1 h wurde der Ansatz aufgereinigt (s. 2.3.1.6).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.3.1.8 Ligation

Für eine erfolgreiche Ligation wurde ein molares Verhältnis von *insert* (kodierende DNA) zu Plasmid von 3:1 gewählt, wobei die Menge an Plasmid zwischen 30-100 ng betrug. Pro Ligationsansatz wurden in einem Volumen von 10 µl 5 U T₄-DNA-Ligase in geeignetem Puffer verwendet und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.1.9 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Cohen *et al.*, 1972 hergestellt. Der gewählte *E. coli*-Stamm wurde auf einer frischen LB-Agarplatte (bei XL1-Blue Zellen Zusatz von Tetracyclin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml LB-Medium mit einem frischen Klon dieser Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium in einer sterilen 500 ml Kulturflasche angeimpft und bei 20 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 2000 × *g* für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 15 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung versetzt und nach 10 min Inkubation auf Eis vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde erneut 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen danach pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und nach 20 min auf Eis erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden nun mit 5 ml CaCl₂-Lösung, die 20 % Glycerol enthielt, resuspendiert und über Nacht auf Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zu 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Außerdem wurde die Transformationseffizienz der Zellen bestimmt, die beim Einsatz von 1 ng DNA bei mindestens 10⁶ Cfu/µg DNA liegen musste.

2.3.1.10 Transformation von kompetenten Zellen

2.3.1.10.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen ca. 3 min auf Eis aufgetaut und dann mit einem Ligationsansatz oder weniger als 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und nachfolgend eine erneute zweiminütige Inkubation auf Eis. Nach Zu-

gabe von 900 µl antibiotikafreiem Medium und einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen bei 13000 × *g* pelletiert. Vom Überstand wurden 800 µl verworfen, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert und je nach Anforderung auf antibiotikahaltige RM- oder LB-Agarplatten ausplattiert über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.10.2 Transformation von *D. discoideum* mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation wird ein kurzer elektrischer Impuls an die Zellen angelegt, so dass die Permeabilität der Zellmembran verändert wird. Die DNA aus der Umgebung kann dadurch in die Zellen aufgenommen werden.

Für die Elektroporation wurden *Dictyostelium*-Zellen über Nacht in Schüttelkultur wachsen gelassen (s. 2.3.3.2.6). Unter der Sterilbank werden pro Transformationsansatz $7 \cdot 10^6$ Zellen 15 min auf Eis gehalten, dann bei 2000 × *g* für 5 min bei 4 °C pelletiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem H50-Puffer gewaschen. Das Pellet wird in 700 µl H50-Puffer resuspendiert, mit 10 µg DNA versetzt, gemischt und zusammen mit sterilen Elektroporations-Küvetten (4 cm) für 5 min auf Eis gelagert. Die Zell/DNA-Suspension wird nach erneutem Durchmischen erst unmittelbar vor der Elektroporation in die Küvetten überführt, um ein Absetzen der Zellen zu vermeiden und mit dem *Gene Pulser[®] II Electroporation System* (50 µF, 1,2 kV, 2 Impulse mit 5 s Abstand) elektroporiert. Die Zellen werden im Anschluss noch 5 min auf Eis inkubiert und dann mit 10 ml HL5-Medium unter Zusatz von 0,5 % Glucose und 100 µl 1 %iger Penicillin/Streptomycin-Lösung in 10 cm Petrischalen bei 22 °C für ca. 20 h inkubiert. Mit dem Wechsel auf Selektionsmedium wurden erfolgreich transformierte *Dictyostelium*-Klone identifiziert (s. 2.3.3.2.5).

2.3.1.11 Blau-Weiß-Screening

Das Prinzip der Blau-Weiß-Selektion beruht auf der Unterbrechung des innerhalb der *multiple cloning site* (MCS) des Plasmids liegenden lacZ-Gens, das für das α-Fragment der β-Galactosidase codiert. Klone die nur den religierten Vektor aufgenommen haben, haben in der MCS keine Veränderung des Abstandes zwischen lacZ-Promotor und lacZ-Gen erfahren und exprimieren nach Zugabe des Induktors Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG) das α-Fragment der β-Galactosidase. Zu-

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

sammen mit dem im *E. coli* XL1-Blue-Genom codierten ω -Fragment der β -Galactosidase ergibt sich eine funktionsfähige β -Galactosidase. Das Enzym spaltete das in den Platten enthaltene Substratanalogon 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal; weiß) zum blauen Abbauprodukt, das die Klone ohne *insert* blau färbt. Bei erfolgreicher Ligation wird der Abstand zwischen dem lacZ-Gen und dem lacZ-Promotor in der MCS des Plasmids so sehr vergrößert, dass eine β -Galactosidase-Bildung durch Abschrift des Gens nicht mehr möglich ist und der Klon weiß erscheint.

Dieses Verfahren wurde für Ligationen in das Plasmid pBluescript II SK (-) durchgeführt und diente der raschen Identifikation erfolgreich transformierter Klone. Dazu wurden auf LB-Amp-Agarplatten jeweils 40 μ l 2 %iges X-Gal und 40 μ l 0,1 M IPTG ausplattiert bevor die transformierten *E. coli* XL1-Blue-Zellen auf der Platte ausgestrichen wurde.

2.3.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung aller PCR-Produkte und Überprüfung von *in vitro* Mutationen erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger bei der mittels PCR DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert werden, die jeweils mit einem bestimmten ddNTP enden.

2.3.1.12.1 DNA-Sequenzierung mit LI-COR™ DNA Sequencer

Zu Beginn der Arbeit wurde mit dem *Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit* gearbeitet. Dazu wurden pro Ansatz 1-2 pmol Plasmid-DNA und 2 pmol fluoreszenzmarkierter Primer mit *Aqua bidest.* auf 13 μ l aufgefüllt. Von der DNA/Primer-Mischung wurden 3 μ l pro Ansatz mit 1,5 μ l ddNTP-Reaktionsmix in PCR-*tubes* gut gemischt und nach Überschichtung mit einem Tropfen Mineralöl mit folgendem Temperaturprogramm amplifiziert (Tabelle 2.3).

	T (°C)	Zeit (sec)
Denaturierung	95	120
25 Zyklen		
Denaturierung	95	30
Annealing	52	30
Extension	70	60
Extension	70	600
Lagerung	4	∞

Tabelle 2.3: PCR-Temperaturprogramm für die Sequenzierung mit dem *Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit*.

Die Ansätze wurden nach der PCR mit 5 µl Formamid-Puffer versetzt und je 0,8 µl pro Ansatz auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen (s. Tabelle 2.4). Die Elektrophorese wurde mit dem Li-COR™ *DNA Sequencer 4200* bei 1500 V mit TBE als Laufpuffer durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der *BaseImagIR V.4.2* Software.

Volumen	Komponente
30 ml	<i>SequaGel® XR 7,5 %</i>
7,5 ml	<i>SequaGel® Complete Buffer Reagent</i>
400 µl	DMSO
300 µl	10 % APS

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Sequenziergels.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.3.1.12.2 DNA-Sequenzierung mit Beckman CEQ™ DNA Sequencer

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde die Sequenzierung mit dem *GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit* durchgeführt, das fluoreszenzmarkierte ddNTPs in einem *master mix* verwendet, dem nur noch DNA und Sequenzier-Primer zugesetzt werden müssen. Es wurden pro Ansatz 50-100 fmol Plasmid-DNA mit *Aqua bidest.* auf 9,5 µl aufgefüllt und ein *preheat* durchgeführt (s. Tabelle 2.5). Danach wurde jedem Ansatz 2 µl *DTCS-master mix* und 1,5 µl (5000 fmol/µl) des jeweiligen Primers zugesetzt. Die Ansätze durchliefen dann das weitere Temperaturprogramm der Sequenzier-PCR (s. Tabelle 2.5).

	T (°C)	Zeit (sec)
Preheat	86	300
20 Zyklen		
Denaturierung	96	20
Annealing	50	20
Extension	60	40
Lagerung	4	∞

Tabelle 2.5: PCR-Temperaturprogramm für die Sequenzierung mit dem *GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit*.

Nach der Sequenzierung wurden die Ansätze entsprechend dem Herstellerprotokoll per Ethanol-fällung aufgereinigt, wobei bei den Waschschritten mit Ethanol die Zentrifugationszeit auf 5 min erhöht wurde um die DNA-Ausbeute zu verbessern. Außerdem wurde die Trocknung an der *SpeedVac* bei 43 °C für 10 min durchgeführt und die Proben im Anschluss in 20 µl Ladepuffer aus dem Kit aufgenommen. Die Auftrennung und Detektion der Sequenzierproben erfolgte mit dem Kapillarsequenzierer CEQ™ 8000. Die Ergebnisse wurden mit der CEQ™ 8000 *Genetic Analysis System* Software ausgewertet.

2.3.1.13 *In vitro* Mutagenese

Um Punktmutationen in DNA einzuführen, wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt, bei der als *template* Doppelstrang-Plasmid-DNA diente. Die spezifischen Mutagenese-Primer (Länge ca. 45 Basen) enthielten die gewünschten Mutationen

etwa in der Mitte und wurden mir freundlicherweise von Frau Bock aus Kiel zur Verfügung gestellt. Für den PCR-Ansatz wurden ca. 80 ng Plasmid-DNA als *template* mit 5 µl 10fach PCR-Puffer (mit MgCl₂), 10 pmol dNTP-Mix, je 30 pmol PCR-Primer und 2 U *PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase AD versetzt und mit *Aqua bidest.* auf 50 µl aufgefüllt. Ein Ansatz ohne DNA diente als Negativkontrolle auf Verunreinigung der Reagenzien. Die Amplifikation wurde entsprechend dem Temperaturprogramm des Herstellers durchgeführt (s. Tabelle 2.6).

	T (°C)	Zeit (sec)
Denaturierung	95	120
20 Zyklen		
Denaturierung	95	30
Annealing	62	30
Extension	72	360
Extension	72	600
Lagerung	4	∞

Tabelle 2.6: PCR-Temperaturprogramm der Mutagenese-PCR für GFP.

Nach Ablauf der PCR wurde die *template*-DNA wie zuvor beschrieben mit *DpnI* verdaut (s. 2.3.1.3) und das Enzym für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Nach Überprüfung der Plasmidsynthese und des Verdaus (s. 2.3.1.5) wurden 5 µl des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* verwendet (s. 2.3.1.10). Der Erfolg der Mutation wurde mittels Sequenzierung von isolierter Plasmid-DNA belegt (s. 2.3.1.12).

2.3.2 Proteinchemische Methoden

2.3.2.1 manuelle Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA

Mit einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie können Proteine aufgereinigt werden, die einen His-*tag* tragen. Die Reinigung und Elution kann dabei sowohl unter nativen Bedingungen mit einem ansteigenden Imidazolgradienten erfolgen, als auch unter denaturierenden Bedingungen mit einem abfallenden pH-Gradienten. Alle manuellen Reinigungen wurden im *gravity-flow* Verfahren mit einem Stufengradienten durchgeführt. Von allen Fraktionen einer Reinigung wurde im Anschluss der Proteingehalt

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

ermittelt (s.2.3.2.4), bei Bedarf die Fraktionen aufkonzentriert (s. 2.3.2.3) und der Erfolg der Reinigung mit SDS-PAGE überprüft (s. 2.3.2.5).

2.3.2.1.1 Native Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Standardmäßig wurden die DDAH-Fusionsproteine nativ aus der löslichen Proteinfraction aufgereinigt (s. 2.3.3.1.5). Die entsprechende Proteinfraction wurde mit 300-1000 µl 50 %iger Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension versetzt und das Protein unter leichtem Schütteln bei 4 °C für 60 min oder über Nacht an die Matrix gebunden. Danach wurde die Suspension auf *Pierce*[®] *Centrifuge Columns* (2ml) überführt und der Durchlauf aufgefangen. Alle Durchläufe, Waschlösungen und Eluate wurden während der Aufreinigung auf Eis gehalten. Die Matrix wurde mit 4-10 Bettvolumina (BV) Waschpuffer mit einem Imidazolgehalt von 0-50 mM gewaschen. Die Elution erfolgte jeweils mit 2-5 BV Elutionspuffer mit 100 und 200 mM Imidazol. Optional wurde die Matrix im Anschluss daran noch mit 2 BV 400 mM imidazolhaltigem Elutionspuffer gewaschen.

2.3.2.1.2 Denaturierende Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Zur denaturierenden Aufreinigung wurde eine *E. coli*-Zellkultur vorbereitet (s. 2.3.3.1.3) und die Zellen mit 5 ml Lysepuffer B pro Gramm Pellet-Nassgewicht resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für 60 min lysiert. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur für 20 min bei 10.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 1 ml 50 %iger Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension/ml Überstand versetzt. Der Ansatz wurde zur Proteinbindung für 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert, dann auf *Pierce*[®] *Centrifuge Columns* (2ml) überführt und der Durchlauf aufgefangen. Die Matrix wurde zweimal mit 4 ml Puffer C und viermal mit 0,5 ml Puffer D gewaschen sowie das Protein viermal mit 0,5 ml Puffer E eluiert.

2.3.2.2 FPLC-basierte Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) wurde für eine native Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose mit einem linearen Imidazolgradienten genutzt. Die Methode wurde an einem *ÄKTA*[™] *Purifier* mit *Unicorn*[™]-Software 5.11 durchgeführt, da dieses System ein Monitoring und eine genaue Steuerung der Reinigung

erlaubt. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Scheidig in Kiel durchgeführt. Es wurde eine *HIS-Select[®] High Flow Cartridge* (1,25 ml) verwendet, die zuerst mit 10 Säulenvolumina *Aqua bidest.*, dann mit 10 Säulenvolumina Elutionspuffer und zuletzt mit 10 Säulenvolumina Waschpuffer bei einem maximalen Gegendruck von 0,7 mPa gespült wurde, um das System optimal vorzubereiten. Als Proteinprobe diente die lösliche Proteinfraction aus *E. coli* (s. 2.3.3.1.5). Die Proteinlösung wurde bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule gezogen, die Säule mit 10 Säulenvolumina imidazolfreiem Puffer gewaschen und Fraktionen zu 1 ml aufgefangen. Dann erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0-500 mM Imidazol im Waschpuffer über 10 Säulenvolumina, wobei wieder 1 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Zuletzt wurde die Säule mit jeweils 10 Säulenvolumina *Aqua bidest.* und 20 % Ethanol zur Konservierung der Matrix gespült.

2.3.2.3 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Für die Aufkonzentrierung von Proteinproben wurden *Amicon[®] Ultra Centrifugal Filter Units* mit einem Molekulargewichts-*cutoff* von 10 kDa für 0,5 bzw. 4 ml Probenvolumen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Zentrifugationen wurden zum Schutz der empfindlichen Proteine jedoch bei 4 °C statt wie angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt. Je nach geschätztem Proteingehalt der Ausgangsprobe wurde eine 5-10fache Konzentrierung vorgenommen, wobei eine Übersättigung der Lösung und ein Ausfällen des Proteins vermieden wurden.

2.3.2.4 Proteingehaltsbestimmung

2.3.2.4.1 Proteinbestimmung mit Bio-Rad-Reagenz

Zu Beginn der Arbeit wurde der Proteingehalt von Präparationen mit dem *Bio-Rad Protein Microassay* bestimmt. Es wurden 0,8-8 µl Proteinlösung gemäß Herstellerangaben mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl des Reagenzes versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben für mindestens 5 min inkubiert bevor die Absorption bei $\lambda = 595$ nm gegen eine Probe ohne Protein gemessen wurde. Als Kalibrierstandards dienten verschiedene Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.3.2.4.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Im späteren Verlauf der Arbeit erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts mit der BCA-Methode nach Smith *et al.*, 1985. Dazu wurden jeweils 10 µl einer Probe mit dem *Pierce*[®] *BCA Protein Assay Kit* gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Als Probenvorbereitung wurde eine Proteinfällung mit dem *Pierce*[®] *Compat-able Protein Assay Kit* durchgeführt um Störungen von Begleitsubstanzen in den Puffermedien zu vermeiden. Die Proben wurden bei 562 nm photometrisch gegen einen Leerwert vermessen. Als Kalibrierstandards dienten wie zuvor verschiedene Konzentrationen an Rinderserumalbumin.

2.3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli, 1970 in SDS-Minigel-Apparaturen verwendet. Zur Trennung wurde ein 6 %iges Sammelgel verwendet, während im Trenngel, je nach Größe der zu trennenden Proteine, mit verschiedenen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen gearbeitet wurde. Die Zusammensetzung der Gele und die zur Herstellung von zwei Minigelen benötigten Mengen sind in Tabelle 2.7 angegeben.

	Sammelgel	Trenngel	Trenngel	Trenngel
	6 %	10 %	12,5 %	15 %
H₂O	2,4 ml	5 ml	4 ml	3 ml
Trenngelpuffer	-	3 ml	3 ml	3 ml
Sammelgelpuffer	1 ml	-	-	-
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0,6 ml	4 ml	5 ml	6 ml
10 % APS	25 µl	80 µl	80 µl	100 µl
TEMED	6 µl	10 µl	10 µl	20 µl

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

Zur Vorbereitung wurden die Proben durch Verdünnung mit *Aqua bidest.* und Zusatz von SDS-Ladepuffer auf einen definierten Gesamtproteingehalt eingestellt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Handelte es sich bei den Proben um GFP-Fusionsproteine wurden die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert, um die Fluoreszenz der Proteine zu erhalten. Es wurden ca. 5-30 µg Gesamtprotein pro Probenspur aufgetragen. Als

Molekulargewichtsmarker wurden anfangs der unstained *peqGOLD Protein-Marker I* und der prestained *peqGOLD prestained Protein-Marker III* benutzt. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde auf den *Mark12™ Unstained Standard* und den *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* gewechselt, da sie mehr Banden lieferten, die eine genauere Molekulargewichtsbestimmung ermöglichten. Die Probenkonzentrierung erfolgte bei 120 V im Sammelgel und die Probenauftrennung bei 200 V im Trenngel. Nach dem Austritt der Bromphenolblaubande aus dem Gel, wurde die Elektrophorese beendet, das Sammelgel entfernt und das fertige Trenngel entweder gefärbt oder für den Western Blot (s. 2.3.2.6) verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung für 1 h gefärbt und dann mit Entfärbelösung bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden unter Schütteln entfärbt.

Die Molekulargewichte der Fusionsproteine wurden per *ExpASy Compute pI/Mw tool* aus der DNA-Sequenz der Proteine berechnet (http://web.expasy.org/compute_pi/).

2.3.2.6 Western Blot

2.3.2.6.1 Elektroblot

Für den Western Blot wurde eine SDS-PAGE wie unter 2.3.2.5 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine im sogenannten *wet*-Verfahren mit der *Mini-Trans-Blot® Cell* auf eine PVDF-Membran übertragen, um sie einer immunologischen Detektion zugänglich zu machen. Dazu wurde die Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und der Blot von Anodenseite wie folgt aufgebaut: Vlies, zwei Lagen *Whatman® Chromatography Paper 3 MM* (Whatman-Papiere), die PVDF-Membran, das luftblasenfrei aufgebrachte Gel, zwei Lagen Whatman-Papiere und ein Vlies. Der Proteinübertrag erfolgte für 2 h (2,5 h für 15 % Gele) bei einer Spannung von 90 V.

2.3.2.6.2 Immunologische Detektion

Freie, unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden nach Ende des Proteinübertrags für 1 h mit 5 % M-TBST-Puffer geblockt und die Membran mit Primärantikörper (Verdünnung 1:5000-1:50.000 in M-TBST) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, dann für 1 h mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10.000-1:50.000 in M-TBST)

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit dem *ECLTM Plus Western Blotting Detection Reagenz* nach Angaben des Herstellers für 3 min. Die auftretende peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion wurde durch Belichtung von *Hyperfilm-ECL* (10 sec bis 15 min) detektiert. Bei jedem Western Blot wurden Kontrollproteine für den jeweils verwendeten Primärantikörper auf dem Blot mitentwickelt um die korrekte Durchführung der immunologischen Detektion sicherzustellen.

2.3.2.6.3 Färbung der Membranen

Die Proteine auf der entwickelten Membran wurden mit einer Ponceau S-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran mit Wasser ab gespült und anschließend kurz mit Ponceau S unter Schütteln gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde die Membran so lange mit Wasser ab gespült bis die Proteine rot gefärbt auf weißem Grund erschienen und dann getrocknet. Die Färbung diente als Kontrolle bei der Auswertung des Western Blots.

2.3.2.7 Thrombinverdau

Der Thrombinverdau wurde zur Abspaltung des GroEL-Chaperons vom gereinigten Fusionsprotein GroEL-hDDAH-2 durchgeführt.

2.3.2.7.1 Zeitabhängigkeit des Thrombinverdaus

Zuerst wurde untersucht bei welcher Inkubationszeit die besten Ergebnisse für den Thrombinverdau resultierten. Dazu wurden pro Ansatz 60 µg Gesamtprotein jeweils mit 2 U bzw. 10 U Thrombin bei 4 °C unter leichtem Schütteln über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Nach 30 min sowie nach 1, 2, 4, 6 und 24 h wurden 30 µl Probe aus dem Ansatz entnommen und alle Proben per SDS-PAGE (s. 2.3.2.5) und Western Blot (s. 2.3.2.6) analysiert.

2.3.2.7.2 Abhängigkeit des Verdaus von Temperatur und Thrombinmenge

In diesem Versuch wurden die Menge des Enzyms und die gewählte Inkubationstemperatur variiert. Es wurden pro Ansatz 30 µg Gesamtprotein jeweils mit 4, 10 und 20 U Thrombin einmal bei 4 °C und einmal bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für 6 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben wie zuvor.

2.3.3 Zellkulturarbeiten

2.3.3.1 Zellkultur von *Escherichia Coli*

2.3.3.1.1 Anlegen von *E. coli*-Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden von erfolgreich transformierten *E. coli*-Stämmen angelegt. Dazu wurden 2 Teile Zellsuspension der Übernachtskultur mit 1 Teil 80 %igem Glycerol versetzt, gut gemischt und bei - 80 °C gelagert.

2.3.3.1.2 Screening auf optimal Bedingungen der Proteinbildung in *E. coli*

Für die Ermittlung optimaler Herstellungsbedingungen wurden die Parameter Temperatur, Induktorkonzentration und Expressionszeit variiert. Die Protein-bildenden Zellen wurden je nach Anforderung in RM-Medium oder LB-Medium kultiviert. Es wurden Vorkulturen aus 5-10 ml Medium mit Selektionsantibiotikum und einem Klon der transformierten Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Als Kontrollen wurden Vorkulturen untransformierter oder Leerplasmid-transformierter Zellen inokuliert. Mit max. 1/20 Volumen der Vorkultur wurden am nächsten Tag 30-50 ml antibiotikahaltiges Medium (keine Antibiotika bei untransformierten Kontrollen) angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Anschließend erfolgten die Induktion der Proteinbildung mit 0-1 mM IPTG und die erneute Inkubation der Kulturen bei 15-37 °C für 2-24 h. Wenn die Expressionstemperatur unter der vorherigen Temperatur zur Vermehrung lag, wurden die Zellen zuerst auf Eis runtergekühlt, bevor die Induktion erfolgte. Die Zellsuspension wurde dann bei 5000 x *g* und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit PBS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Entfernung des Überstands bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Für hDDAH-2 wurde ein Herstellungsversuch in Anlehnung an die Publikation von Hong & Fast, 2007 durchgeführt (im Folgenden als "Fast"-Methode bezeichnet). Dazu wurden wie oben beschrieben Vor- und Hauptkultur angeimpft. Dann wurde die Hauptkultur jedoch bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert, die Temperatur auf 15 °C abgesenkt bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war, mit 100 µM IPTG induziert

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

und bei 15 °C über Nacht (ca. 16 h) kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

2.3.3.1.3 Proteinherstellung in *E. coli*-Großkulturen

Zur Gewinnung größerer Proteinmengen für Reinigungsversuche und Aktivitätsstudien, wurden die entsprechenden *E. colis* unter optimalen Bedingungen im größeren Kulturansatz kultiviert. Dazu wurden Vorkulturen aus 50 ml Medium mit Selektionsantibiotikum und einem Klon der transformierten Zellen angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 600-1000 l Medium mit 1/20 Volumen der Vorkultur angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 15-30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Anschließend erfolgten die Induktion der Proteinbildung und die Kultivierung der Zellen mit den zuvor ermittelten, optimalen Bedingungen. Die Ernte der Zellen erfolgte wie unter 2.3.3.1.2 beschrieben.

2.3.3.1.4 Herstellung von *E. coli*-Zelllysaten

Zur Lyse der Zellen wurden eingefrorene *E. coli*-Zellen vor dem Aufschluss auf Eis aufgetaut und die Zellen je nach hergestelltem Fusionsprotein im entsprechenden Lysepuffer aufgearbeitet (s. Tabelle 2.8).

Lysepuffer	Fusionsprotein
Hochsalzlysepuffer	hDDAH-2, DnaK-hDDAH-2, GroEL-hDDAH-2
Hochsalzlysepuffer (Äkta)	hDDAH-2Elong
JL-Lysepuffer	hDDAH-2JL
Standard-Lysepuffer	alle anderen

Tabelle 2.8: Übersicht über die Lysepuffer zur Aufarbeitung der Fusionsproteine in Zellen.

E. coli-Zellen aus dem Screening der Expressionsbedingungen wurden mit Hilfe von Lysozym aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer/100 mg Zellen mit 10.000 U Lysozym, 1 mM PMSF und 50 U *Benzonase*[®] *Nuclease* resuspendiert und für min. 1 h oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. *E. coli*-Zellen aus dem Großkulturansatz wurden mit Hilfe des *French*[®] *Press Cell Disrupters* aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in 10-25 ml Lysepuffer unter Zusatz von 1 mM PMSF resuspendiert, in die *French*[®] *Press*-Zelle überführt und die Zellen zweimal durch Anlegen eines Drucks von 19.000 psi bei 4 °C lysiert.

2.3.3.1.5 Präparation von Proteinfractionen

Von den gewonnenen Lysaten (s. 2.3.3.1.4) wurden mittels stufenweiser Zentrifugation die verschiedenen Proteinfractionen gewonnen. Dazu wurde das Lysat bei 5000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer und *inclusion bodies* zu entfernen. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und 4 °C für 45 min in die lösliche Proteinfraction (Überstand) und die Fraction der Membranproteine (Pellet) aufgetrennt. Ausgehend vom Lysat wurde von jeder Proteinfraction eine Probe auf Eis für weitere Analysen gelagert. Die Pellets der beiden Zentrifugationen wurden dabei entsprechend ihrer Größe in 50-1000 µl Lysepuffer resuspendiert. Es wurde der Proteingehalt der Fractionen ermittelt (s. 2.3.2.4.1) und SDS-Proben der Fractionen auf Proteinbildung analysiert (s. 2.3.2.6).

2.3.3.2 Zellkultur von Dictyostelium discoideum

Alle Arbeiten mit *D. discoideum* wurden in Kooperation mit Frau Dr. von Bülow aus Kiel durchgeführt, die auch den verwendeten *D. discoideum*-Stamm AX2 zur Verfügung stellte. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt, wobei alle verwendeten Geräte, Medien und Plastikwaren ebenfalls zuvor sterilisiert wurden.

Die *Dictyostelium*-Zellen wuchsen im Inkubator bei 22 °C entweder adhärent auf Petrischalen oder als Schüttelkultur in Schikanekolben. Alle verwendeten Puffer oder Medien wurden vor der Verwendung auf 22 °C erwärmt.

2.3.3.2.1 Keimung von Sporen-Dauerkulturen

Mit einer Pipettenspitze wurde eine Probe vom gefrorenen Glycerolstock der Sporen (s. 2.3.3.2.9) abgenommen und in einer 10 mm Petrischale in 10 ml HL5-Medium mit 0,5 % Glucose unter vorsichtigem Schwenken suspendiert. Die Zellen wurden für 2-3 Tage bei 22 °C ohne Schütteln inkubiert bis eine konfluente Schicht amöboidaler Zellen gewachsen war. Die Kulturen wurden nach vier Wochen verworfen und neu hergestellt, um die Wahrscheinlichkeit genetischer Veränderungen zu reduzieren.

2.3.3.2.2 Mediumswechsel

Das Medium der Zellen wurde alle zwei Tage gewechselt, indem das alte Medium vorsichtig abgesaugt wurde und die Platte unter leichtem Schwenken mit einigen ml

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

frischem, glucosehaltigen Medium zur Entfernung toter, schwimmender Zellen gewaschen wurde. Danach wurde die Platte mit 10 ml frischem Medium versetzt und weiter bei 22 °C inkubiert. Das Medium wurde immer vorsichtig am Rand der Platte zugegeben, um ein Abspülen von lebenden Zellen zu reduzieren.

2.3.3.2.3 Passagieren von Zellen

Wenn die Zellen auf den Petrischalen konfluent gewachsen waren, wurden sie passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit frischem, glucosehaltigen Medium gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden mit 1 ml Medium von der Platte gelöst und 900 µl der Suspension verworfen. Zu den verbliebenen Zellen wurde 9 ml frisches HL5-Medium mit 0,5 % Glucose gegeben und die Zellen bei 22 °C inkubiert.

2.3.3.2.4 Klone picken

Auf der Petrischale adhärent gewachsene Klone wurden unter dem Mikroskop gepickt, wenn sie einen Durchmesser von mindestens 1 mm erreicht hatten (nach ca. 7 d). Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit der Pipette von der Schale geschabt und gleichzeitig etwas Medium aufgezogen. Die Zellen wurden an den Rand von 24-well Platten pipettiert und mindestens 1 h ruhig stehen gelassen bevor sie mit 2 ml Geneticin-Selektionsmedium (10 µg G418/ml Medium) versetzt wurden.

2.3.3.2.5 Geneticinselektion

Die Selektion der Geneticin-resistenten Klone erfolgte nach der Transformation (s. 2.3.1.10.2) mit HL5-Medium dem 10 µg G418/ml Medium zugesetzt wurde. Das Selektionsmedium wurde das erste Mal nach sieben Tagen und dann alle zwei Tage ausgewechselt, wobei das Absaugen und Zufuhr frischen Mediums immer an derselben markierten Stelle durchgeführt wurde, um Zellen potentieller Klone nicht miteinander zu vermischen.

2.3.3.2.6 Anlegen von Flüssig-Schüttelkulturen

Zur Gewinnung größerer Mengen *D. discoideums* wurden Flüssig-Schüttelkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Petrischale zuerst mit 1 ml Medium gewaschen und mit der gleichen Menge von der Platte gelöst und in einen 300 ml Schikanekolben mit 100 ml HL5-Medium überführt. Die Zellen wurden

bei 22 °C und 150 rpm bis zu einer Zellzahl von $1,6 \cdot 10^8$ Zellen vermehrt (s. 2.3.3.2.7).

2.3.3.2.7 Bestimmung der Zellzahl und der Generationszeit

Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, was einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml entspricht, wurden die Zellen der Schüttelkultur alle 24 h gezählt. Von den Schüttelkulturen wurden Proben in der Verdünnung 1:10 oder 1:50 in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop bei 10facher Vergrößerung gezählt. Die Zellzahl ergibt sich aus dem Mittelwert der Zellzahl von 10 Großquadraten unter Einbeziehung des Kammerfaktors (0,000125) und der Verdünnung der Zellen. Die Generationszeit konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$t_g = (\log 2 \cdot dt) / (\log N - \log N_0)$$

N ist die Endzellzahl, N_0 die Ausgangszellzahl und dt die Kulturzeit.

Adhärent gewachsene Zellen wurden wie unter 2.3.3.2.3 beschrieben vorbereitet und die Suspension der lebenden Zellen 1:10-1:100 verdünnt ausgezählt.

2.3.3.2.8 Herstellung von *D. discoideum*-Zelllysaten

Die Zellen einer Flüssig-Schüttelkultur (s. 2.3.3.2.6) wurden bei $2000 \times g$ für 5 min bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden bei -80 °C bis zum Aufschluss gelagert. Zum Aufschluss wurden die Zellen ca. 5 min bei 37 °C aufgetaut und in 1 ml eiskaltem KK2-Puffer, dem 20 mM EDTA zugesetzt waren, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 15-mal vorsichtig mit Hilfe einer 1ml Spritze mit 23G Kanüle lysiert, wobei eine Schaumbildung möglichst vermieden wurde. Der Proteingehalt der Lysate wurde ermittelt (s. 2.3.2.4.1) und es wurden SDS-Proben der Lysate auf Proteinbildung analysiert (s. 2.3.2.6).

2.3.3.2.9 Anlegen von Sporendauerkulturen

Zum Anlegen von Sporendauerkulturen wurden $1 \cdot 10^8$ *D. discoideum*-Zellen 5 min bei $1000 \times g$ und 4 °C pelletiert, zweimal mit 20 ml kaltem SPB gewaschen und in 5 ml kaltem SPB resuspendiert. Diese 5 ml wurden dann auf einer Phosphatagarplatte ausgestrichen und die Platten mindestens 30 min unter der

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Sterilbank getrocknet. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Platten wurden bei 22 °C für 2 d bis zur visuell sichtbaren Sporenbildung inkubiert. Die Sporen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gekratzt, in ein Gefrierrohrchen mit 500 µl 80% Glycerol überführt, gut durchmischt und bei -80 °C eingefroren.

2.3.4 Fluoreszenzmessungen und Fluoreszenzmikroskopie

2.3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Zellen, die GFP-Fusionsproteine herstellen sollten, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10facher Vergrößerung visuell auf die Bildung fluoreszierender Proteine untersucht. Von *D. discoideum* wurden Fotos der Amöben in 96-well Mikrotiterplatten mit dem *ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System* bei 100facher Vergrößerung gemacht. Dazu wurden die lebenden Zellen mit Sörensen-Phosphat-Puffer soweit verdünnt, dass sie einzeln fotografiert werden konnten. Es wurden sowohl lichtmikroskopische Aufnahmen als auch Fluoreszenzbilder mit einem Filter für GFP bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemacht.

2.3.4.2 In-Gel-Fluoreszenzmessung

Um In-Gel-Fluoreszenzmessungen durchzuführen, wurden die Proben wie in Abschnitt 2.3.2.5 beschrieben auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde im *LumiImagerTMF1* bei 520 nm belichtet und mit der *LumiAnalyst* Software ausgewertet.

2.3.4.3 Fluoreszenzmessung in Mikrotiterplatten

Zur Bestimmung der Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen in Proteinfractionen wurden 200 µl einer Probe auf eine *OptiPlateTM-96* überführt und im *LS55 Fluorescence Spectrometer* mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm bei 2,5 mm Splitbreiten vermessen. Alle Proben wurden zuvor auf einen einheitlichen Gesamtproteingehalt eingestellt und dann soweit verdünnt, dass die Fluoreszenz im messbaren Bereich lag. Alle Proben wurden doppelt vermessen und um die Fluoreszenzwerte der Puffer korrigiert, wobei die gesamte Platte dreimal pro Assay vermessen und zwei Messungen pro Assay durchgeführt wurden.

2.3.5 Stabilitätsanalytik von GFP

Es wurden GFP-bildende *E. coli*-Zellen aus jeweils 150 ml Kulturvolumen untersucht (s. 2.3.3.1.3). Dabei wurden die Zellen einmal unter nativen Bedingungen (s. 2.3.3.1.5) und einmal unter denaturierenden Bedingungen (s. 2.3.2.1.2) lysiert. Anschließend wurden die Lysate bei 4 °C für 20 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand auf Eis gelagert. Es wurde immer eine Prüfreihe des Enzyms unter nativen und unter denaturierenden Bedingungen getestet, die Proben nach der Behandlung kurz auf Eis gelagert und dann wie unter 2.3.4.3 beschrieben vermessen. Die Stabilität des GFP wurde durch Änderung der Fluoreszenz behandelte Proben im Vergleich zur unbehandelten Ausgangsprobe bestimmt.

2.3.5.1 Temperaturstabilität

Zur Ermittlung der Temperaturstabilität wurden pro Prüfreihe zweimal 100 µl Probe für 10 min bei folgenden Temperaturen (°C) in einem Heizblock inkubiert: 25, 37, 50, 60, 70, 80, 90.

2.3.5.2 Einfrier-Auftau-Stabilität

Es wurde pro Prüfreihe zweimal 1 ml Proteinlösung in Eppendorfreaktionsgefäßen bei -20 °C eingefroren und nach vollständigem Durchfrieren der Probe wieder auf Eis aufgetaut. Die Proteinlösungen durchliefen fünf Einfrier-Auftau-Zyklen, wobei nach jedem Auftauen 100 µl Probe zur Fluoreszenzmessung gezogen wurden.

2.3.5.3 pH-Stabilität

Die Messungen zur pH-Stabilität wurden in 5 ml Kryoröhrchen durchgeführt, um neben den eingesetzten 2 ml Proteinlösung noch ausreichend Platz zur Messung der Probe und zur Aufnahme von Säure bzw. Base zu bieten. Es wurden zwei Ansätze pro Prüfreihe bearbeitet. Zuerst wurde der pH-Wert der Proteinlösung vor Behandlung überprüft der ca. bei 8 liegen sollte. Dann wurde der pH-Wert der Proteinlösung unter vorsichtigem Zusatz von 25 %iger Salzsäure auf folgende pH-Werte abgesenkt: 7, 6, 5, 4, 3. Nach jeder Zugabe von Säure oder Base wurde das Kryoröhrchen verschlossen und vorsichtig, langsam über Kopf gekippt bis eine gute Durchmischung bei minimaler Schaumbildung erreicht war. Dann wurde beim Erreichen einer

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

pH-Stufe 150 µl Probe gezogen und der pH-Wert zum Abschluss wieder mit Natriumhydroxid-Lösung vorsichtig auf pH 8 angehoben. Die Messungen wurden mit einem *METROHM 605 pH-Meter* mit *BlueLine 16 pH Mikro-Elektrode* durchgeführt.

2.3.6 Aktivitätsstudien an rekombinanten Enzymen

2.3.6.1 *In vitro* Aktivitätsassay mit HPLC-Analytik

2.3.6.1.1 *In vitro* Aktivitätsassay in Eppendorfreaktionsgefäßen

Die Aktivität der rekombinant exprimierten hDDAH-2 wurde zu Beginn der Arbeit mit einer im Arbeitskreis entwickelten HPLC-Analytik bestimmt (Kotthaus, 2008). Als Proteinquelle wurden die 100 mM bzw. 200 mM imidazolhaltigen Elutate aus der Affinitätschromatographie verwendet. Ein Reaktionsansatz bestand aus 0,4-36 µg Gesamtprotein mit 500 µM ADMA in einem Gesamtvolumen von 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4. Die Ansätze wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen für 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 75 µl Acetonitril. Die Proben wurden für 5 min geschüttelt, zentrifugiert (10.000 × *g*, 5 min) und der Überstand per HPLC auf L-Citrullin-Bildung vermessen. Es wurden zusätzlich Kontrollen ohne Protein und ohne Substrat inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 2 µg hDDAH-1 in 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 für 1 h bei 37 °C inkubiert und nach entsprechender Aufarbeitung vermessen.

2.3.6.1.2 HPLC-Analytik

Für die Analyse der DDAH Aktivitäts-Assays (s. 2.3.6.1.1) mittels HPLC-Analytik 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 474 und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: NovaPak RP-18-Säule 4 µm (4 x 150 mm)

Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur: 25 °C

Flussrate: 1 ml/min

Mobile Phase: Eluent A und Eluent B nach folgendem Gradientenprofil

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	-
12	100	-
15	30	70
19	30	70
20	100	-
40	100	-
41	100	-

Tabelle 2.9: Gradientenprofil der HPLC-Analytik für die L-Citrullin Detektion.

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

Injektionsvolumen: 10 μl

Derivatisierung: 10 μl der Probe wurden mit 14 μl Derivatisierungs-Reagenz (s. 5.9.7) gemischt und 2 min bei RT vor der Injektion inkubiert

Retentionszeiten: L-Citrullin 8,6 \pm 0,2 min
 ADMA 19,1 \pm 0,2 min
 Dimethylamin 24,0 \pm 0,1 min (Peak 1)
 25,7 \pm 0,2 min (Peak 2)

2.3.6.1.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Für die Siebenpunkt-Kalibrierung wurden L-Citrullin-Konzentrationen im Bereich von 1-75 μM in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 vermessen.

Zur Wiederfindung wurde L-Citrullin in denselben Konzentrationen wie bei der Kalibrierung mit 5 μg (Gesamtprotein) hitzedenaturierter hDDAH-2 in 75 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 75 μl Acetonitril geschüttelt. Im Anschluss wurde das Protein abzentrifugiert (10.000 $\times g$, 5 min). Die Überstände wurden per HPLC vermessen.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.3.6.2 Kolorimetrischer L-Citrullin Plattenreader-Assay

2.3.6.2.1 *In vitro* Aktivitätsassay in der Mikrotiterplatte

Die Aktivität der rekombinant exprimierten DDAH-2-Proben wurde im späteren Verlauf der Arbeit direkt auf besonders hitzestabilen 96-well Mikrotiterplatten in Anlehnung an die Publikation von Knipp & Vasák, 2000 bestimmt. Die Proben wurden in einer Dreifachbestimmung pro Assay untersucht.

Ein Inkubationsansatz bestand aus 150 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 mit den Substraten L-NMMA, ADMA, *S*-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und *N*^ω-Amino-L-arginin in einer jeweiligen Endkonzentration von 300 µM. Durch Zugabe von 2 µg rekombinantes Enzym wurde die Reaktion gestartet. Die Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und über 30 min auf einem Platten-Inkubator bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Das gebildete L-Citrullin wurde wie unter 2.3.6.2.2 beschrieben derivatisiert. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Achtpunkt-Kalibrierung von 0-100 µM L-Citrullin durchgeführt. Als Kontrollen wurden Ansätze mit rekombinant hergestellter hDDAH-1 und jeweils Ansätze ohne Protein bzw. ohne Substrat inkubiert.

Neben der Bestimmung der Aktivität des reinen Enzyms wurde die Aktivität auch in Lysaten (s. 2.3.3.1.5) und Überständen nach einer Zentrifugation bei 54.000 × *g* untersucht. Dazu wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein der Fraktion in 100 mM Dinatriumphosphat-Puffer pH 6,8 mit den Substraten L-NMMA, ADMA, SMTC und *N*^ω-Amino-L-arginin in einer jeweiligen Endkonzentration von 4 mM für 60 min bei 37 °C inkubiert. Kontrollansätze und weitere Aufarbeitung der Proben erfolgten wie bei dem Assay mit reinem Enzym.

2.3.6.2.2 Derivatisierung

Die Derivatisierung des L-Citrullins erfolgte mit zwei Reagenz-Lösungen, die zusammen das Derivatisierungs-Reagenz (*Colder*-Reagenz) ergeben (s. 5.9.7) (Knipp & Vasák, 2000). Das *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 Proben (150 µl) wurden auf den Mikrotiterplatten mit 200 µl des *Colder*-Reagenz versetzt und die Platte zum Schutz

vor Verdunstung mit einer hitzestabilen Klebefolie verschlossen. Im Anschluss erfolgte die Farbentwicklung im Trockenschrank auf einer Metallplatte von der Größe der Mikrotiterplatte für einen optimalen Wärmetransfer bei 95 °C über 15-20 min. Vor der photometrischen Vermessung wurde die Platte mit den Proben unter Lichtschutz auf Raumtemperatur abgekühlt und dann sofort die Farbintensität der Proben bei 540,5 nm gemessen.

2.3.7 Klonierungsarbeiten/Mutationen

Für PCR-Amplifikationen der *inserts* diente bei der hDDAH-2 das Plasmid DDAH-2pQE30 und bei der hDDAH-1 das Plasmid DDAH-1pQE30 als *template*-DNA (s.2.3.1.3). Die Hilfe wurde gewählt, wenn neue Schnittstellen an der DNA-Sequenz des Zielproteins erzeugt werden sollten oder die Sequenz durch Elimination eines Stop-Codons oder Einfügen von Basen zum Ausgleich einer Leserahmenverschiebung modifiziert werden musste. Nach erfolgter PCR und *DpnI*-Verdau der Ursprungs-DNA wurden die PCR-*inserts* gereinigt, mit den gewählten Restriktionsenzymen verdaut (s. 2.3.1.4) und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid ligiert (s. 2.3.1.8). Wurden die *inserts* aus Konstrukten gewonnen, so wurde das DNA-Fragment des *inserts* nach Verdau und Elektrophorese des Konstruktes (2.3.1.5) aus dem Gel aufgereinigt (s. 2.3.1.6) und in das ebenso geschnittene und gereinigte Zielplasmid ligiert (s. 2.3.1.8).

Die Plasmide und Co-Plasmide für die Expression von DnaK-hDDAH-2 bzw. GroEL-hDDAH-2 stellte mir freundlicherweise Dr. Panagiotidis aus Thessaloniki zur Verfügung. Die Plasmide pETM-33 und pETM-14 stammten vom EMBL, Heidelberg, und das Plasmid pProEx-Hta wurde von Dr. Roper aus Warwick zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pBluescript II SK (-), pIVEX2.3wGFPc, pDXA-GFP2 und pTX-GFP stellte mir freundlicherweise Prof. Beitz aus Kiel zur Verfügung.

In den nachfolgenden Tabellen (s. Tabelle 2.10 bis Tabelle 2.12) sind die hergestellten Konstrukte und die dazu verwendeten Primer in Kurzbezeichnung (s. 5.4.2) aufgeführt.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Konstrukt	Resultierendes Fusionsprotein	Herstellung	Primer
DDAH-2pQE30	hDDAH-2	Arbeitskreis Prof. Clement	-
DDAH-2pQE30Elong	hDDAH-2Elong	Dr. Jürke Kotthaus, 2008	-
DDAH-2(pXCK) pBluescript II SK (-)	-	<i>insert:</i> BamHI/HindIII aus PCR-Produkt pBluescript II SK (-): BamHI/HindIII	(1) + (2)
DDAH-2pXCK-K	DnaK-hDDAH-2	<i>insert:</i> BamHI/HindIII aus	-
DDAH-2pXCK-EL	GroEL-hDDAH-2	DDAH-2(pXCK) pBluescript II SK (-) pXCK-K/pXCK-EL: BamHI/HindIII	-
DDAH-1pIvex2.3wGFPC	-	<i>insert:</i> XbaI/BamHI aus PCR-Produkt pIVEX2.3wGFPC: XbaI/BamHI	(5) + (6)
DDAH-2pIvex2.3wGFPC	hDDAH-2-GFP	<i>insert:</i> XbaI/SmaI aus PCR-Produkt pIVEX2.3wGFPC: XbaI/SmaI	(7) + (4)
DDAH-2pETM-33	GST-hDDAH-2	<i>insert:</i> NcoI/XhoI aus PCR-Produkt pETM-33: NcoI/XhoI	(3) + (8)
DDAH-2pETM-14	2fach His-tag hDDAH-2	<i>insert:</i> NcoI/XhoI aus DDAH-2pETM-33 pETM-14: NcoI/XhoI	-
DDAH-2pProEx-Hta	hDDAH-2JL	<i>insert:</i> EcoRI/XbaI aus PCR-Produkt pProEx-Hta: EcoRI/XbaI	(11) + (12)

Tabelle 2.10: Klonierung der Konstrukte für die Expression in *E. coli*.

Die Sequenz der hDDAH-2 wurde für die Plasmide pXCK-K bzw. pXCK-EL am N-Terminus mit einer BamHI-Schnittstelle und einem Adenin zum Ausgleich einer

Leserahmenverschiebung sowie am C-Terminus mit einer HindIII-Schnittstelle unter Elimination des Stop-Codons versehen. Nach Subklonierung in das Plasmid pBluescript II SK (-) und Identifikation positiver Klone per Blau-Weiß-Screening, wurde die DDAH-2 im Vektor sequenziert (2.3.1.12.1) und das DDAH-2 Fragment im Anschluss daran in den jeweiligen Zielvektor umkloniert.

Das Plasmid pIVEX2.3wGFPc trug noch einen HA-tag, der durch Restriktionsverdau mit den angegebenen Enzymen entfernt wurde. Dabei wurde jedoch auch ein Teil der Plasmid-Sequenz mit der wichtigen Ribosomen-Bindestelle (RBS) entfernt. Daher wurde sowohl die DDAH-1-DNA-Sequenz als auch die DDAH-2-DNA am N-Terminus per PCR mit einer neuen Schnittstelle und einer modifizierten RBS-haltigen Sequenz amplifiziert (s. Abbildung 2.3). Für die Amplifikation der hDDAH-1 wurde dabei eine *touch-down*-PCR (TD-PCR) durchgeführt, um zuvor aufgetretene Probleme bei der Anlagerung eines Primers zu vermeiden (Korbie & Mattick, 2008). Am C-Terminus beider Sequenzen wurde außerdem eine neue Schnittstelle generiert und das Stop-Codon entfernt.

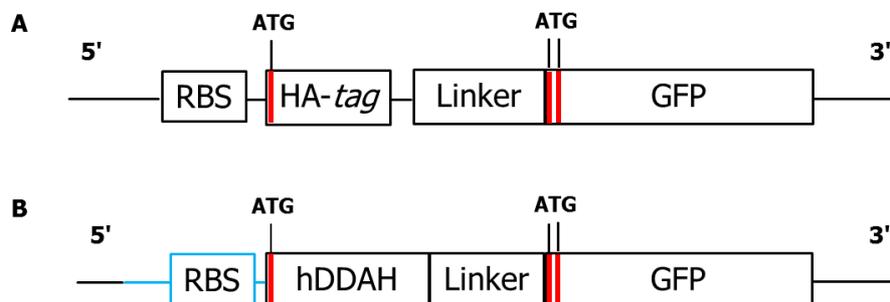


Abbildung 2.3: Schema der DDAH-Klonierung in das Plasmid pIVEX2.3wGFPc.

A: Schema der Sequenz von pIVEX2.3wGFPc. **B:** Sequenz von DDAHpIVEX2.3wGFPc. Die roten Balken kennzeichnen die potenziellen Startpunkte für die Proteinbiosynthese. Blau dargestellt ist die modifizierte N-terminale Sequenz mit Ribosomenbindestelle (RBS).

An der DDAH-2-DNA wurden für die Plasmide pETM-33 und pProEx-Hta jeweils neue Schnittstellen generiert und das Stop-Codon am C-Terminus eliminiert.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Konstrukt	Resultierendes Fusionsprotein	Herstellung	Primer
DDAH-2pDXA-GFP2	hDDAH-2dGFP	<i>insert:</i> HindIII/blunt aus PCR-Produkt pDXA-GFP2: KpnI blunted/ HindIII	(9) + (10)
DDAH-2pTX-GFP	dGFP-hDDAH-2	<i>insert:</i> BamHI/XhoI aus DDAH-2pRS425Met25 pTX-GFP: BamHI/XhoI	-

Tabelle 2.11: Klonierung der Konstrukte für die Expression in *D. discoideum* (dGFP).

Bei den Konstrukten DDAH-2pETM-14 und DDAH-2pTX-GFP erfolgte eine Umklonierung wie oben beschrieben. Das Plasmid DDAH-2pRS425Met25 stammt dabei aus meiner Diplomarbeit (Altmann, 2009). Eine Ligation in das Plasmid pDXA-GFP2 war für die Expression eines C-terminalen GFP-Fusionsproteins nur über HindIII und KpnI möglich. Der KpnI-Verdau konnte aber nicht durchgeführt werden, da die DDAH-2 in der Sequenz eine KpnI-Schnittstelle trägt und im Falle eine Verdau die Sequenz zerstört worden wäre. Daher erfolgte hier eine Klonierung halb *sticky* über HindIII und halb *blunt*. Das Plasmid pDXA-GFP2 wurde mit KpnI verdaut, die DNA-Sequenz *gebluntet* (s. 2.3.1.7), gereinigt und HindIII verdaut. An den Enden der DDAH-2-DNA wurden neue Schnittstellen generiert und das Stop-Codon entfernt, aber nur am HindIII-Ende die Schutzbasen verdaut. Die Schutzbasen des Primers blieben an der KpnI-Schnittstelle erhalten und verhinderten nach Ligation in das Plasmid eine Leserahmenverschiebung (s. 5.4.2).

Konstrukt	Resultierendes Fusionsprotein	Herstellung	Primer
pIvex2.3wGFPcMut	GFPMut	Mutagenese von pIvex2.3wGFPc	(13) +(14)
DDAH-1pIvex2.3wGFPc Mut	hDDAH-1-GFPMut	Mutagenese von DDAH-1pIvex2.3wGFPc	
DDAH-2pIvex2.3wGFPc Mut	hDDAH-2-GFPMut	Mutagenese von DDAH-2pIvex2.3wGFPc	

Tabelle 2.12: Mutagenese von Konstrukten.

Zur Elimination der ATG-Codons am Anfang der GFP-Sequenz wurden alle Konstrukte mit denselben Primern mutiert (s.2.3.1.13, 0). Alle Konstrukte wurden nach erfolgter Klonierung und *in-vitro* Mutagenese durch Sequenzierung überprüft (s. 2.3.1.12).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Rekombinante Herstellung von hDDAH-2 in *E. coli*

Für alle Versuche die humane DDAH-2 gentechnologisch in *E. coli* herzustellen, wurden für jedes Fusionsprotein zuerst die optimalen Expressionsbedingungen in kleinen Kulturansätzen ermittelt (s. 2.3.3.1.2). Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert (s. 2.3.3.1.4 und 2.3.3.2.8), die verschiedenen Proteinfractionen bei Bedarf mittels serieller Zentrifugation gewonnen (s. 2.3.3.1.5) und ihr Proteingehalt bestimmt (s. 2.3.2.4). Die Bildung von hDDAH-2-Fusionsproteinen wurde in Lysaten und UZ-Überständen (= lösliche Proteinfraction) per SDS-Page (s. 2.3.2.5) und Western Blot (s. 2.3.2.6) ermittelt. Als Kontrollprotein für die korrekte Durchführung der Blot-Analyse wurde denaturierend gereinigte hDDAH-2 (s. 2.3.2.1.2) aus einer vorhergehenden Arbeit genutzt (Altmann, 2009). Die Spur des Markers (meist in der Mitte) wurde aus der Darstellung aller Blots entfernt.

Bei nachgewiesener hDDAH-2-Bildung wurde das Protein in größeren Kulturansätzen hergestellt und Versuche zu seiner Reinigung durchgeführt (s. 2.3.2.1 und 2.3.2.2). Abschließend wurde die Aktivität der hDDAH-2-Fusionsproteine im Vergleich zur rekombinant hergestellten hDDAH-1 bestimmt (s. 2.3.6.2).

2.4.1.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für N-terminal His-getaggte hDDAH-2

Am Anfang dieser Arbeit wurde die humane DDAH-2 als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-*tag* hergestellt. Dazu wurden die von Kotthaus erzeugten Plasmide DDAH-2pQE30 und DDAH-2pQE30Elong verwendet (Kotthaus, 2008). Die damit erzeugten Proteine standen einer affinitätschromatographischen Reinigung über den speziellen 6fachen RGS-His-*tag* zur Verfügung.

Die Arbeiten wurden mit einem Screening zur Proteinbildung mit dem Plasmid DDAH-2pQE30 in *E. coli* BL-21(DE3)pRep4-Zellen unter Variation der Temperatur (15-30 °C) und der Induktorkonzentration (10 oder 100 µM IPTG) begonnen (s. 2.3.3.1.2). Die Proteinbildung erfolgte über Nacht. Die Zellen wurden bereits er-

folgreich zur Herstellung von hDDAH-1 verwendet und mir freundlicherweise von Prof. Dr. Beitz, Kiel zur Verfügung gestellt.

Die Proteinbildung von 50 ml-Kulturansätzen wurde per Western Blot (s. 2.3.2.6) in der löslichen Proteinfraction bestimmt (s. Abbildung 2.4). Dabei sollte das hDDAH-2-Fusionsprotein ein ungefähres Molekulargewicht von 31 kDa haben. Dieses Molekulargewicht setzte sich aus dem Molekulargewicht der hDDAH-2 von 29,644 (Datenbank: UniProtKB, Eintrag: O95865) und dem Molekulargewicht des 6fachen Histidinrests von ca. 1 kDa zusammen.

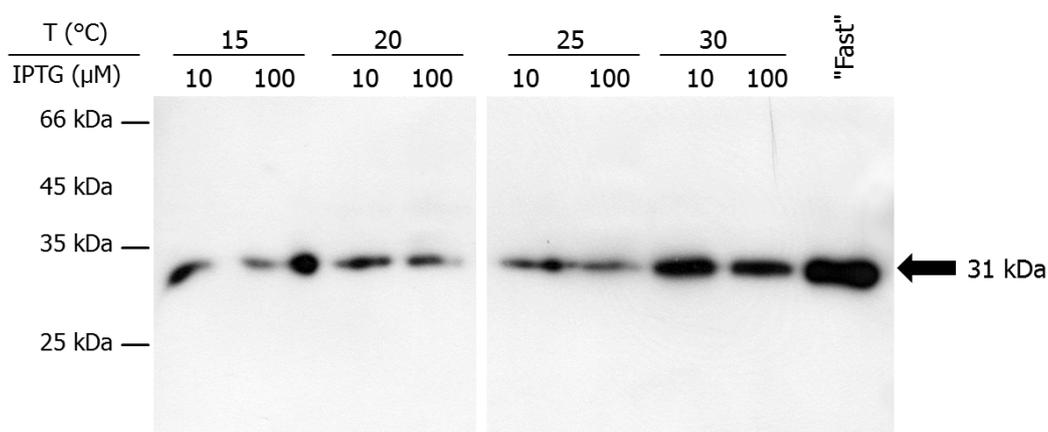


Abbildung 2.4: Western Blot-Analyse der hDDAH-2-Bildung in *E. coli* bei Variation der Expressionsbedingungen.

Aufgetragen wurden 3 µg Gesamtprotein der löslichen Proteinfractionen. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen den RGS-His-tag (1:30.000) und Anti-Maus-Antikörper (1:30.000). Eine Bande für die hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert.

Ein Signal für die DDAH-2 konnte in diesem Versuch unter allen getesteten Herstellungsbedingungen detektiert werden. Damit war es erstmals in unserer Gruppe erfolgreich gelungen, humane DDAH-2 als lösliches Protein rekombinant in *E. coli* herzustellen.

Das hDDAH-2-Signal wurde in der cytosolischen Proteinfraction wie erwartet bei ca. 31 kDa nachgewiesen (s. Abbildung 2.4). Bei 15 °C und 25 °C war die DDAH-2-Bildung nur schwach, bei 30 °C stärker ausgeprägt. Die Erhöhung der IPTG-Konzentration um das 10fache bei Ansätzen, die bei gleicher Temperatur kultiviert wurden, führte zu keiner deutlich gesteigerten Proteinbildung.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Das stärkste Signal und damit die beste Ausbeute löslicher hDDAH-2 konnte im Blot bei der Herstellung nach der "Fast"-Methode nachgewiesen werden (Hong & Fast, 2007).

Parallel zum Screening der optimalen Herstellungsbedingungen wurden für das Plasmid DDAH-2pQE30 auch Versuche mit verschiedenen *E. coli*-Expressionszellen durchgeführt. Dabei wurde die Proteinbildung von hDDAH-2 in BL-21(DE3)pRep4-Zellen mit der von BL-21-CodonPlus-RIL-Zellen verglichen (s. Abbildung 2.5).

Die BL-21-CodonPlus-RIL-Zellen wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. Scheidig aus Kiel zur Verfügung gestellt. Ihre Besonderheit lag in der Bereitstellung zusätzlicher Kopien der Codons für die Aminosäuren Arginin (Codons AGA and AGG), Isoleucin (AUA) und Leucin (CUA) für die zelluläre Proteinbildung. Ein gesteigerter Bedarf dieser in *E. coli* seltenen Codons, kann bei der Synthese von wirtsfremden Proteinen wie der humanen DDAH-2 zur Reduktion der Proteinbildung durch ein *codon usage* führen. Durch Verwendung von CodonPlus-Zellen kann diese Limitierung aufgehoben werden.

Für den Versuch wurden 30 ml-Kulturansätze des Plasmids in beiden Zelllinien bei 25 °C und 30 °C nach Zugabe von 100 µM IPTG für 4 h kultiviert. Die Proteinbildung wurde in Lysaten und Überständen der Ultrazentrifugation (UZ-Überstände), die die lösliche Proteinfraction darstellten, per Western Blot untersucht werden (s. Abbildung 2.5).

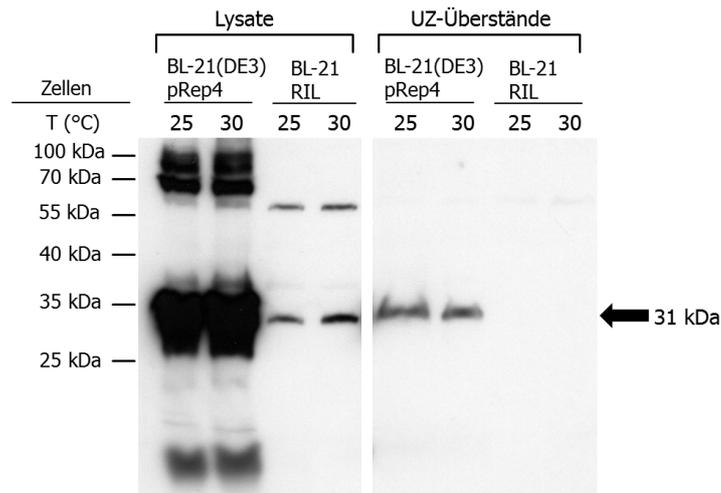


Abbildung 2.5: Western Blot-Analyse der hDDAH-2-Bildung in verschiedenen *E. coli*-Expressionszellen.

Aufgetragen wurden 9 µg Gesamtprotein der jeweiligen Proteinfraktion. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2 (1:20.000). Eine Bande für die hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert. BL-21-RIL: BL-21-CodonPlus-RIL-Zellen.

Im Western Blot konnte die hDDAH-2 in den Lysaten beider Zelllinien bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.5). Dabei lieferten die Lysate von DDAH-2-bildenden BL-21(DE3)pRep4-Zellen deutlich stärkere Signale, als die BL-21-CodonPlus-RIL-Zellen, was auf eine höhere Rate der Proteinbildung schließen ließ. Ein Nachweis der DDAH-2 in der löslichen Proteinfraktion war nur bei BL-21(DE3)pRep4-Zellen möglich.

Verglich man die Signalintensität innerhalb einer Zelllinie bei unterschiedlichen Temperaturen, konnte im Gegensatz zum vorherigen Expressionsscreen kein deutlicher Unterschied zwischen der Proteinbildung bei 25 °C und 30 °C gesehen werden.

Bei der Analyse wurden noch weitere Signale oberhalb von ca. 55 kDa und bei ca. 15 kDa in den Lysaten detektiert. Bei der Entwicklung der Proben ohne Primärantikörper traten keine Banden auf (Daten nicht gezeigt). Dies bewies, dass alle Banden der Detektion durch den Anti-DDAH-2-Antikörper zugeordnet werden konnten. Als Ursache der unerwarteten Banden kommen unvollständig gebildete hDDAH-2 (Bande bei ca. 15 kDa) und mögliche DDAH-2-Multimere oder Aggregate der DDAH-2 mit anderen Proteinen (Erhöhung des Molekulargewichts) in Frage.

Die Ergebnisse beider Screenings zeigten deutlich, dass nur mit BL-21(DE3)pRep4-Zellen eine Herstellung löslicher humaner DDAH-2 möglich war und dass die beste

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Ausbeute löslichen Proteins mit der "Fast"-Methode (Hong & Fast, 2007) erreicht wurde. Daher erfolgten weitere Versuche zur hDDAH-2-Herstellung in diesen Zellen mit der optimierten Methode.

2.4.1.2 Etablierung einer nativen Reinigungsmethode für His-getaggte hDDAH-2 aus der cytosolischen Fraktion von *E. coli*

Mit der erfolgreichen Herstellung löslicher hDDAH-2 bot sich erstmals die Möglichkeit, die Enzymaktivität nativer hDDAH-2 zu testen. Dafür mussten jedoch erst die bakterielle Herstellung größerer Mengen und eine Methode zur nativen Reinigung des Proteins etabliert werden.

Für das *scale-up* der Proteinherstellung wurden hDDAH-2-bildende *E. coli*-Zellen in einem 1000 ml Ansatz nach der Methode von Fast und Hong für die Proteinherstellung kultiviert (s. 2.3.3.1.3). Anschließend wurden die Zellen per *French*[®] *Press* aufgeschlossen (s. 2.3.3.1.4) und die verschiedenen Proteinfractionen gewonnen. Vor Beginn der Reinigungsversuche wurden von allen Stufen der Fraktionierung Proben per Western Blot auf DDAH-2-Vorkommen untersucht (s. Abbildung 2.6).

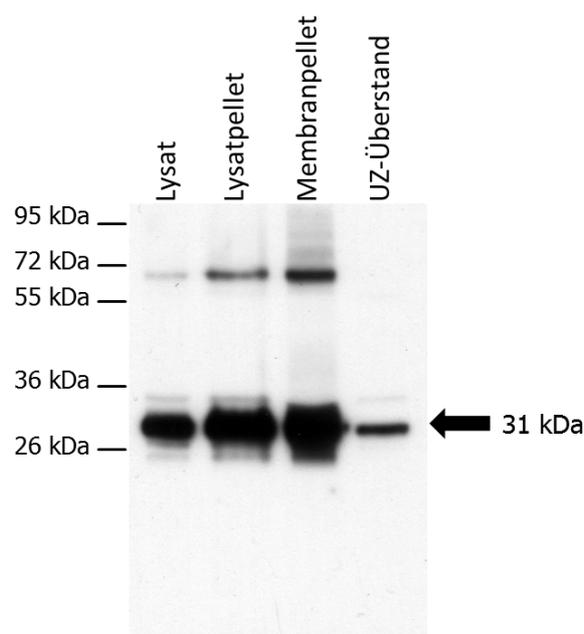


Abbildung 2.6: Western Blot-Analyse der Proteinfractionen von *E. coli*-Zellen, die N-terminal His-getaggte hDDAH-2 bilden.

Aufgetragen wurden 22 µg Gesamtprotein der jeweiligen Proteinfraction. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2 (1:50.000). Eine Bande für die hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert.

Bei der Untersuchung wurde ein Signal für hDDAH-2 bei 31 kDa in allen Proteinfraktionen nachgewiesen (s. Abbildung 2.6). Dabei waren die Signale für das Enzym in den Pellets etwas stärker als im Lysat, was auf eine Anreicherung des Proteins in diesen Fraktionen hindeutete. Zusätzlich wurde im Lysat, Lysatpellet und Membranpellet ein Signal für ein mögliches DDAH-2-Dimer bei ca. 60 kDa detektiert.

Im cytosolischen Überstand wurde, verglichen mit den anderen Fraktionen, ein schwächeres Signal für hDDAH-2 identifiziert. Damit war der Anteil des löslichen Proteins an der gebildeten Gesamtproteinmenge gering aber ausreichend für eine Reinigung. Daher wurde mit der cytosolischen Fraktion eine native Reinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose durchgeführt (s. 2.3.2.1.1). Das Protein wurde unter leichtem Schütteln für zwei Stunden bei 4 °C an 300 μl Matrix gebunden. Die Matrix wurde anschließend mit 10 Bettvolumina (BV) imidazolfreiem Puffer gewaschen. Weitere Waschschrte erfolgten mit 6 BV Puffer mit 10 mM Imidazol und 4 BV Puffer mit 20 mM Imidazol. Danach wurden die Proteine mit je 2 BV Puffer mit 100, 200 und 400 mM Imidazol eluiert. Die Fraktionen der Reinigung wurden aufkonzentriert (s. 2.3.2.3) und der Proteingehalt bestimmt (s. 2.3.2.4.1). Es wurden Proben gleichen Proteingehaltes von allen Fraktionen der Reinigung hergestellt und per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (s. Abbildung 2.7).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

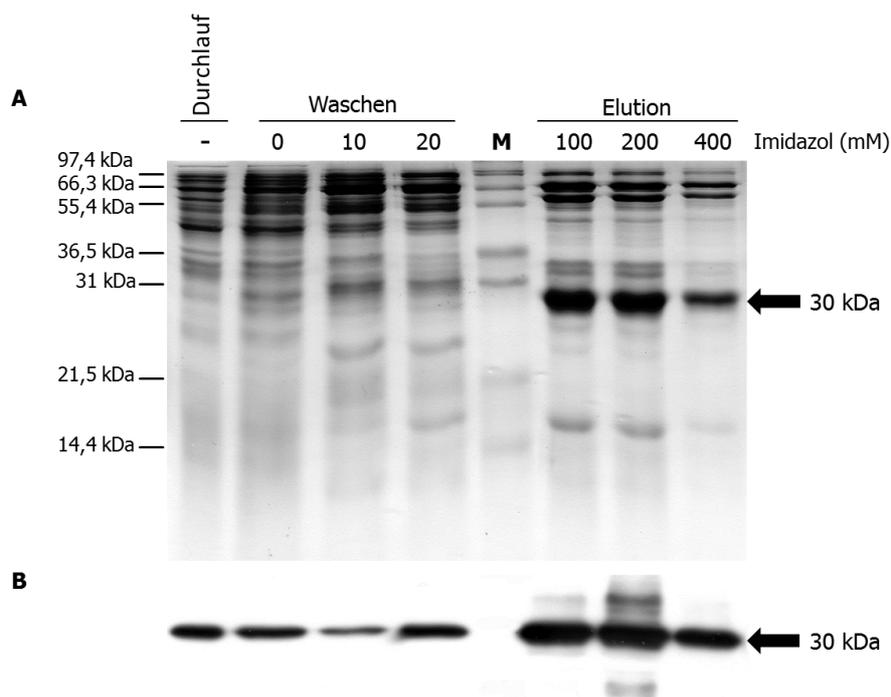


Abbildung 2.7: Analyse der hDDAH-2-Reinigung an Ni²⁺-NTA.

SDS-Analyse (**A**) und Western Blot (**B**) von 15 µg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion der hDDAH-2-Reinigung. Die Detektion der hDDAH-2 erfolgte im Blot mit einem Antikörper gegen den RGS-His-*tag* (1:50.000) und Anti-Maus-Antikörper (1:50.000). Eine Bande für die hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa detektiert.

Die native Reinigung der hDDAH-2 per Affinitätschromatographie brachte einen Teilerfolg. Zwar gelang nur eine anteilige Reinigung des Proteins, es konnte aber in den Eluat stark angereichert werden (s. Abbildung 2.7). Die Identität der hDDAH-2 wurde per Western Blot mit der Detektion des His-*tags* bewiesen.

Bei der Auswertung der SDS-PAGE waren einige Fremdproteine als Verunreinigung in den Eluat erkennbar. Dies deutete auf eine unzureichende Bindung der hDDAH-2 an die Ni²⁺-NTA-Matrix hin, wodurch es zur Coelution von *E. coli*-Wirtsproteinen kam. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von Protein und Matrix über Nacht führte zu keiner besseren Bindung und Reinigung der hDDAH-2. Variationen der Reinigungsbedingungen wie Zusammensetzung der Puffer, Puffervolumen zum Waschen der Matrix oder Einführung weiterer Waschschrte brachten ebenfalls keine Verbesserung der DDAH-2-Reinigung (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden bei dieser Reinigungsmethode ca. 0,8-1 mg partiell gereinigte DDAH-2 (Gesamtproteingehalt) aus einem Liter Bakterienkultur gewonnen.

2.4.1.3 Untersuchung der *in vitro* Aktivität rekombinant hergestellter His-getaggtter hDDAH-2

Nachdem es gelungen war die DDAH-2 per Affinitätschromatographie nativ anzureichern, sollte die Enzymaktivität des Proteins durch Umsetzung des Substrates ADMA zu L-Citrullin per HPLC untersucht werden (s. 2.3.6.1). Für Kontrollinkubationen zur korrekten Durchführung aller Aktivitätsuntersuchungen wurde hDDAH-1 benötigt. Das Enzym wurde daher zuerst, wie zuvor beschrieben (Kotthaus, 2008), rekombinant in einer 1000 ml *E. coli*-Großkultur hergestellt und an Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt (s. Abbildung 2.8).

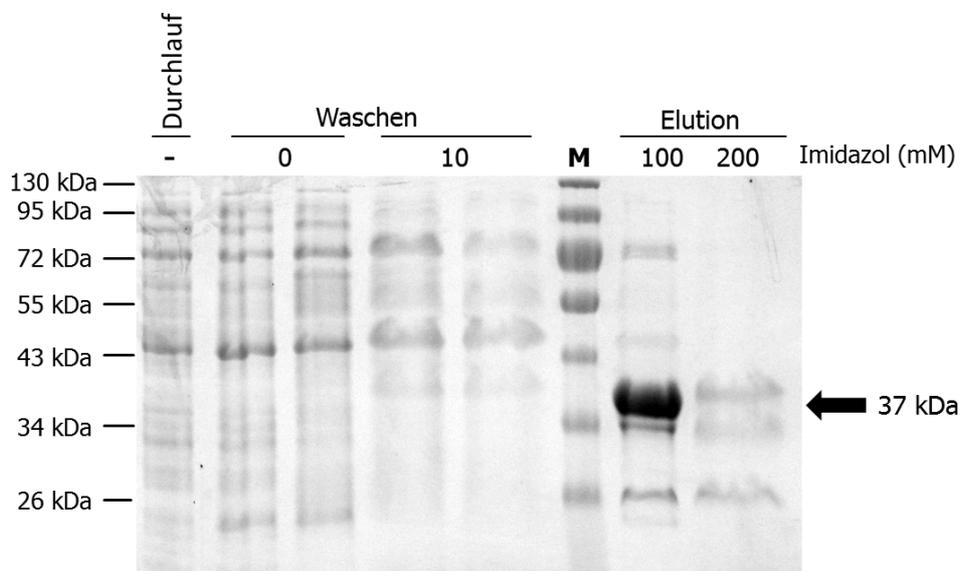


Abbildung 2.8: SDS-Analyse der hDDAH-1-Reinigung an Ni²⁺-NTA.

Aufgetragen wurden 5 µg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion der hDDAH-1-Reinigung. Eine Bande für die hDDAH-1 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa detektiert.

Die rekombinant hergestellte hDDAH-1 konnte im Vergleich zur hDDAH-2 sehr gut per Affinitätschromatographie gereinigt werden. Sie wurde fast ausschließlich in der 100 mM imidazolhaltigen Fraktion bei 37 kDa nachgewiesen (s. Abbildung 2.8). Für das Fusionsprotein wurde nach Datenbankrecherche ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa (31,122 kDa für DDAH-1 plus 1 kDa für den His-tag) erwartet (Datenbank: UniProtKB, Eintrag: O94760). Das detektierte Molekulargewicht des Enzyms lag damit höher als erwartet.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Die Eluate wiesen nach der Reinigung noch geringfügige Kontaminationen mit Wirtsproteinen auf, die jedoch erfahrungsgemäß die Enzymaktivität nicht negativ beeinflussen (Kotthaus, 2008).

Die Bestimmung der *in vitro* Aktivität der nativen hDDAH-2 wurde mit zwei verschiedenen Chargen des partiell gereinigten Enzyms durchgeführt (s. 2.3.6.1.1). Dabei wurden die 100 mM bzw. 200 mM imidazolhaltigen Eluate der hDDAH-2-Reinigung verwendet. Es wurden 0,4-36 µg Gesamtprotein hDDAH-2 bzw. 2 µg hDDAH-1 mit 500 µM ADMA für 3 h bei 37 °C inkubiert. Für jeden Ansatz wurden zwei parallele Inkubationen durchgeführt und alle Proben doppelt vermessen (s. 2.3.6.1.2). Außerdem wurde eine Mischung aller Standard-Substanzen analysiert.

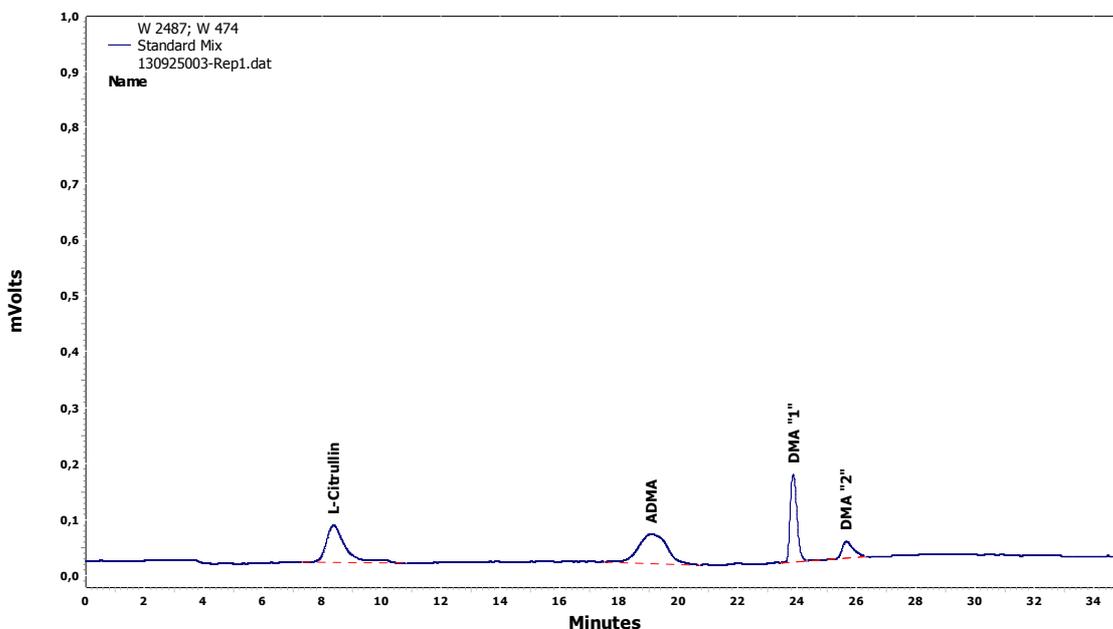


Abbildung 2.9: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Trennung von L-Citrullin, ADMA und Dimethylamin.

Dargestellt ist ein Standardansatz bestehend aus 10 µM L-Citrullin, 10 µM ADMA und 10 mM Dimethylamin in 50 mM Kaliumphosphatpuffer-Puffer (pH 7,4).

Mit der verwendeten HPLC-Methode war es möglich L-Citrullin, ADMA und Dimethylamin (DMA) zu trennen. Ein repräsentatives Chromatogramm der Standards ist in Abbildung 2.9 gezeigt. Dabei musste DMA in einer 1000fach höheren Konzentration als die beiden anderen Standards eingesetzt werden, um ein Signal detektieren zu können. Außerdem lieferte der DMA-Standard je zwei Peaks, selbst wenn die

Substanz frisch gelöst und sofort vermessen wurde, was auf eine Verunreinigung der Substanz hindeutete.

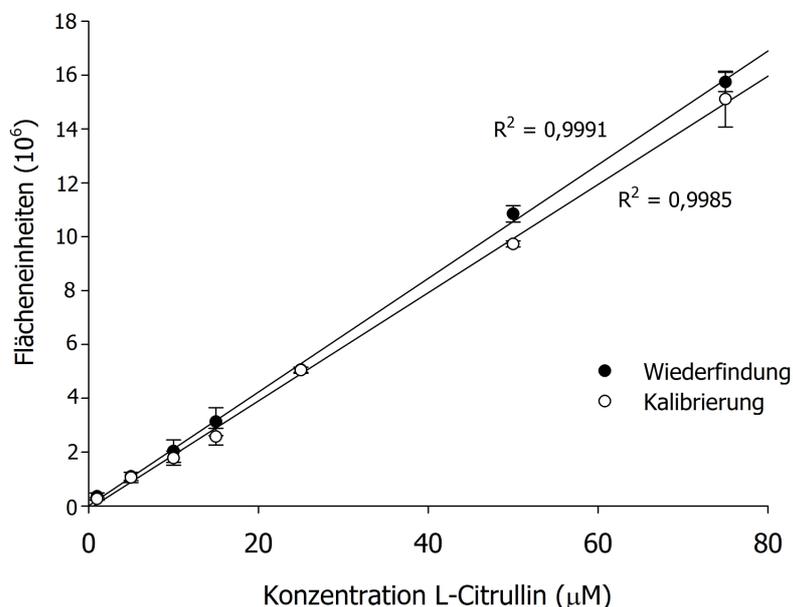


Abbildung 2.10: Kalibrierung und Wiederfindung für L-Citrullin.

Für die Kalibrierung wurden L-Citrullin-Konzentrationen im Bereich von 1-75 µM in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 vermessen. Zur Wiederfindung wurde L-Citrullin in denselben Konzentrationen nach Inkubation mit 5 µg (Gesamtprotein) hitzedenaturierter hDDAH-2 in 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 vermessen (s. 2.3.6.1.3). Die ermittelten Flächeneinheiten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Reaktionsansätzen, die parallel inkubiert und jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden für L-Citrullin (s. Abbildung 2.10) waren in dem Bereich von 5-75 µM linear ($R^2 > 0,998$). Für den Bestimmungsbereich der Kalibriergeraden betrug die Richtigkeit ($99,3 \pm 3,2$) %, wobei die Richtigkeit an der Bestimmungsgrenze (5 µM) einen Wert von 103,1 % aufwies. Für den Bestimmungsbereich der Wiederfindungsgeraden betrug die Richtigkeit ($100,4 \pm 9,4$) %, wobei die Richtigkeit an der Bestimmungsgrenze (5 µM) einen Wert von 116,8 % aufwies.

Die Inkubation humaner rekombinant hergestellter DDAH-1 diente der Kontrolle des Assays um die Möglichkeit einer Substratumsetzung von ADMA zu L-Citrullin unter den gewählten Versuchsbedingungen zu belegen. Dafür ist in Abbildung 2.11 ein repräsentatives Chromatogramm der Inkubation von hDDAH-1 angegeben.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

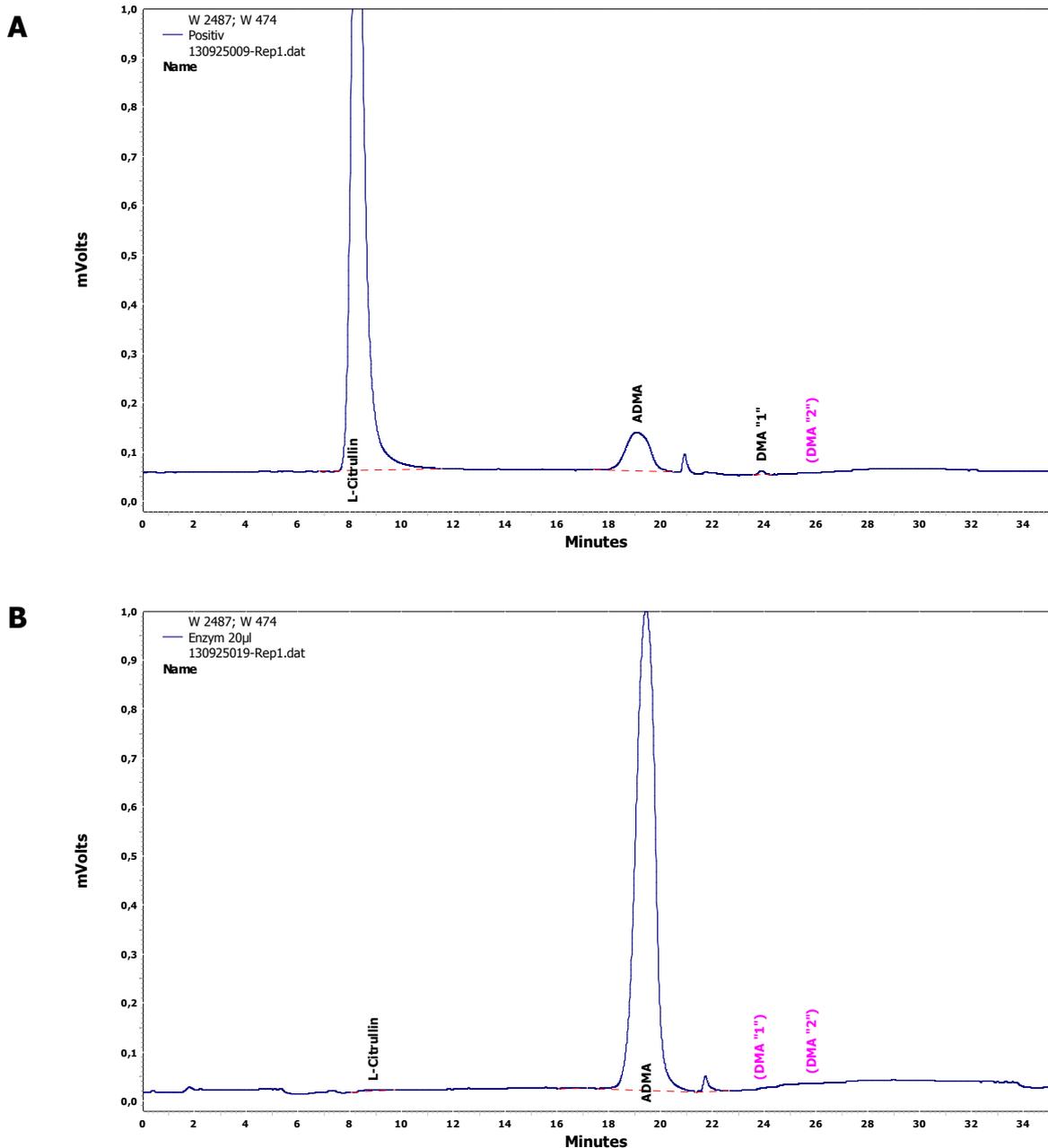


Abbildung 2.11: Repräsentative HPLC-Chromatogramme der Inkubation von rekombinant hergestellten hDDAHs.

Repräsentative Chromatogramme für einen Inkubationsansatz bestehend aus 2 µg gereinigter, rekombinant hergestellter hDDAH-1 (**A**) bzw. 10 µg (Gesamtprotein) partiell gereinigter, rekombinant hergestellter hDDAH-2 (**B**) mit 500 µM ADMA in 50 mM Kaliumphosphatpuffer-Puffer (pH 7,4). Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und die L-Citrullin-Bildung per HPLC vermessen.

Wie aus dem starken L-Citrullin-Peak in Abbildung 2.11 A ersichtlich war, setzte die humane DDAH-1 das Substrat ADMA wie erwartet zu L-Citrullin um. Dabei lag die errechnete Umsetzungsrate für hDDAH-1 bei $(0,265 \pm 0,003) \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein. Da die Umsetzung nicht vollständig war, wurde noch ein kleiner ADMA-Peak de-

tektiert. Das Fehlen eines Dimethylamin-Peaks wurde auf eine Produktbildung unterhalb der für DMA 1000fach höheren Nachweisgrenze zurückgeführt.

Im Gegensatz dazu konnte bei keinem der Inkubationsansätze mit partiell gereinigter hDDAH-2 eine L-Citrullin-Bildung aus ADMA beobachtet werden. Wie aus dem repräsentativen Chromatogramm in Abbildung 2.11 B ersichtlich ist, wurde nur ein Peak für das nicht umgesetzte Substrat ADMA detektiert. Damit wurde klar gezeigt, dass hDDAH-2 im Gegensatz zur Isoform 1 kein ADMA umsetzt, obwohl beide Enzyme als N-terminal His-getaggte Proteine rekombinant in *E. coli* hergestellt wurden.

2.4.1.4 Untersuchungen an einer rekombinant hergestellten N-terminal verlängerten His-tag hDDAH-2

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wurden Versuche zur Optimierung der Reinigung von hDDAH-2 mit dem Plasmid DDAH-2pQE30Elong durchgeführt.

Mit dem Plasmid wurde eine hDDAH-2 (im Folgenden als "hDDAH-2Elong" bezeichnet) hergestellt, bei der eine Linker-Sequenz (18 Aminosäuren) den Abstand zwischen His-tag und hDDAH-2-Sequenz vergrößerte. Dadurch sollte der His-tag besser für die Aufreinigung zugänglich gemacht werden. Außerdem sollte so eine Beeinflussung des aktiven Zentrums der hDDAH-2 durch den stark positiv geladenen His-tag verhindert werden. Mit der Faktor Xa-Schnittstelle in der Linkersequenz bestand zudem die Möglichkeit den His-tag nach erfolgreicher Reinigung des Proteins gegebenenfalls abspalten zu können.

Zur Proteinbildung wurden die von Kotthaus ermittelten Kulturbedingungen für hDDAH-2Elong genutzt (Kotthaus, 2008). Sie lieferten in einem Vorversuch lösliches Protein (Daten nicht gezeigt). Für das *scale-up* wurde ein 800 ml Ansatz transformierter *E. coli*-Zellen wie unter 2.3.3.1.3 beschrieben bei 30 °C kultiviert und die Proteinbildung durch 100 µM IPTG induziert. Nach der Ernte wurden die Zellen per *French*[®] Press lysiert (s. 2.3.3.1.4) und die lösliche Proteinfraction gewonnen (s. 2.3.3.1.5). Die hDDAH-2Elong wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Scheidig in Kiel per FPLC mit einem linearen Imidazolgradienten an Ni²⁺-NTA gereinigt (s. 2.3.2.2). Ein repräsentatives Chromatogramm der FPLC-Reinigung ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

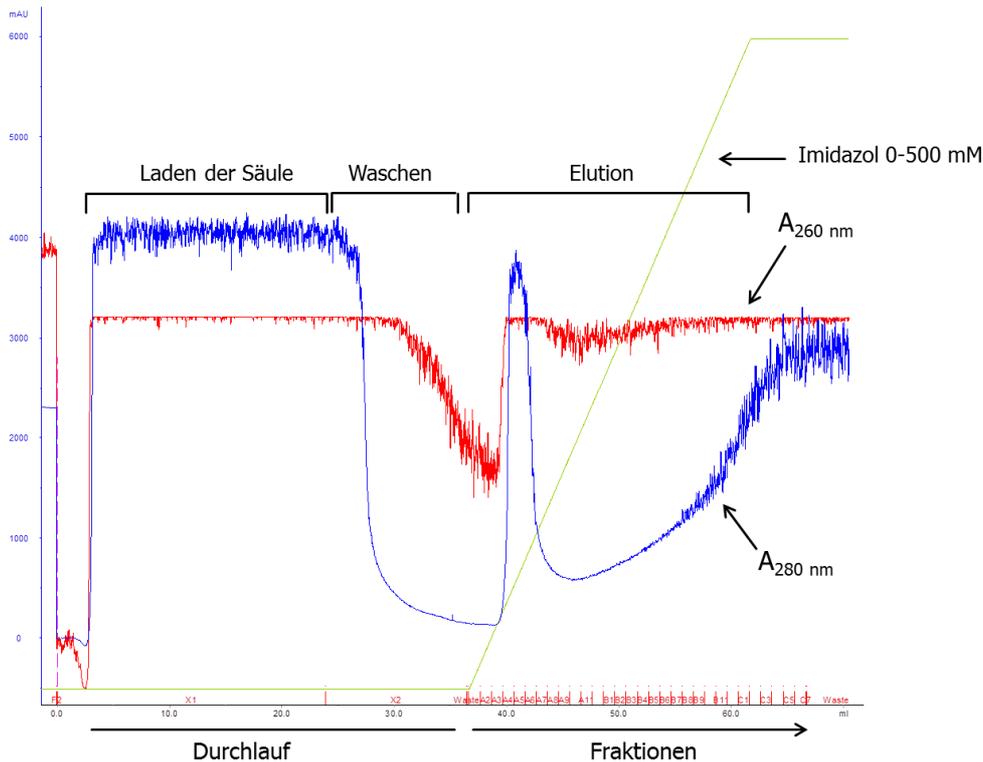


Abbildung 2.12: Repräsentatives FPLC-Chromatogramm der DDAH-2Elong-Reinigung.

Im Chromatogramm der FPLC-Reinigung ließ sich das Laden der Säule mit Proteinlösung, das Waschen und die Proteinelution mit der Absorptionsmessung bei 280 nm optimal verfolgen (s. Abbildung 2.12). So zeigte sich bereits kurz nachdem die Säule mit einem linearen Imidazolgradienten gespült wurde, ein deutlicher Peak über vier Fraktionen für die Elution von Protein. Die gleichzeitige Messung der Absorption bei 260 nm gab einen Hinweis auf die Verunreinigung der Fraktionen. Demnach deutete sich an, dass die Fraktionen nicht rein waren.

An Hand des Chromatogramms wurden die proteinhaltigen Eluat-Fraktionen der Reinigung ausgewählt und per SDS-PAGE und Western Blot auf DDAH-2-Vorkommen untersucht (s. Abbildung 2.13).

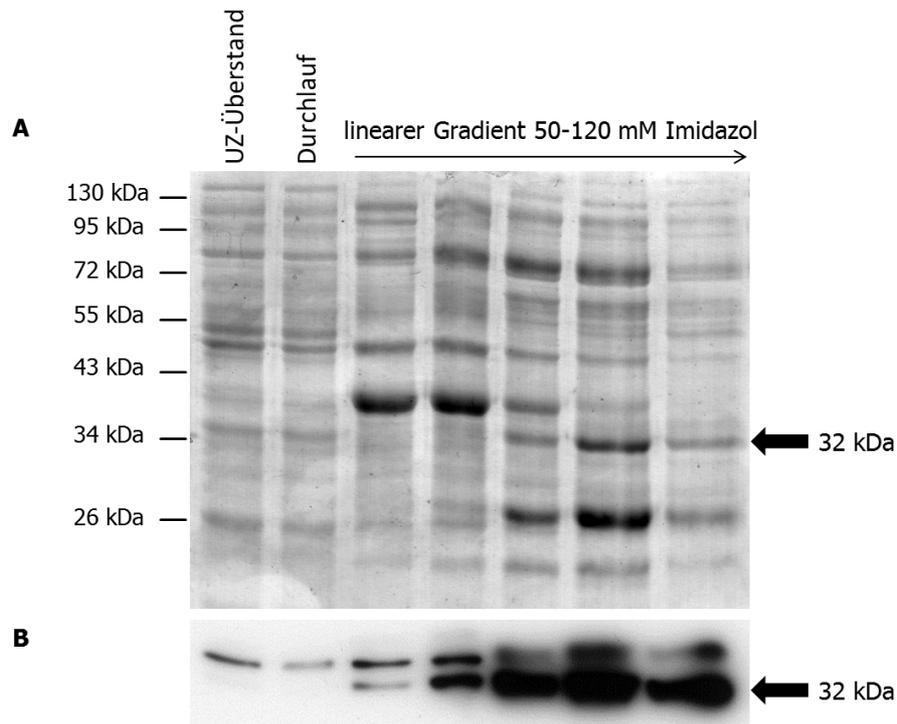


Abbildung 2.13: Analyse der hDDAH-2Elong-Reinigung an Ni²⁺-NTA.

SDS-Analyse (**A**) und Western Blot (**B**) von 9 µg Gesamtprotein ausgewählter Fraktionen der FPLC-Reinigung. Die Detektion der hDDAH-2Elong erfolgte im Blot mit einem Antikörper gegen DDAH-2. Eine Bande für die hDDAH-2Elong wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa detektiert.

Bei der SDS-PAGE der Reinigung konnte die hDDAH-2Elong bei einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa in Fraktionen ab einem Imidazolgehalt von ca. 90 mM detektiert werden (s. Abbildung 2.13). Die Identität des Proteins wurde mit dem Anti-DDAH-2-Antikörper bestätigt, der Banden bei dem erwarteten Molekulargewicht von 32 kDa und zusätzlich eine Bande bei ca. 34 kDa detektierte.

Die SDS-Analyse diente auch der Reinheitsanalyse der Fraktionen. Der Nachweis zahlreicher Banden von Wirtsproteinen in allen Eluatn verdeutlichte, dass durch die Modifikationen am Fusionsprotein weder die Bindung der DDAH-2 an die Matrix noch ihre Reinigung verbessert wurde.

2.4.1.5 Herstellung und Reinigung beidseitig His-getaggtter hDDAH-2 in *E. coli*

Nachdem keines der N-terminal His-getaggtten hDDAH-2-Proteine eine erfolgreiche Gewinnung reiner DDAH-2 ermöglichte, wurden Versuche mit einem beidseitig His-

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

getaggten Fusionsprotein durchgeführt. Das Ziel dieser Versuche war, die Reinigung löslicher hDDAH-2 zu verbessern.

2.4.1.5.1 Herstellung von beidseitig His-getaggtter hDDAH-2

Für die Versuche stand ein Plasmid (pETM-14) zur Verfügung, mit dem beidseitig His-getaggte Fusionsproteine hergestellt werden konnte. Eine Schnittstelle für PreScission-Protease ermöglichte am N-Terminus die Abspaltung des His-tags.

Für die Herstellung des Fusionsproteins wurde die hDDAH-2-DNA in das Plasmid pETM-14 kloniert (s. 2.3.7) und das so neu gewonnene Plasmid in *E. coli* BL-21(DE3)-Zellen transformiert (Zellen zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Beitz, Kiel). Mit Vorkulturen von DDAH-2pETM-14 und pETM-14 tragenden Zellen wurden 50 ml-Kulturansätze angeimpft und unter Variation der Temperatur (25 oder 30 °C) und der Induktorkonzentration (0-1 mM IPTG) für 5 h kultiviert (s. 2.3.3.1.2). Die Proteinbildung wurde per Western Blot (s. 2.3.2.6) in der löslichen Proteinfraction der Zellen aller Ansätze bestimmt (s. Abbildung 2.14).

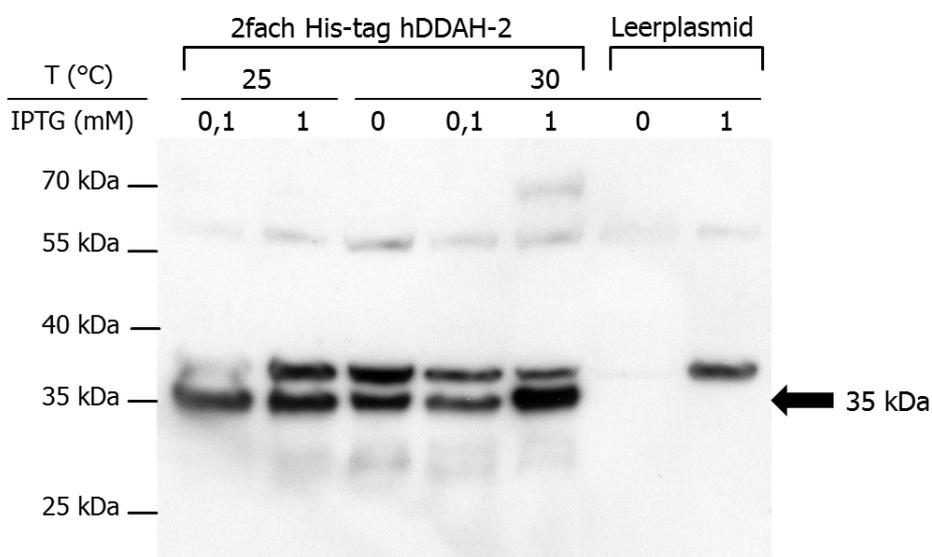


Abbildung 2.14: Western Blot-Analyse der Bildung 2fach His-tag hDDAH-2 in *E. coli* bei Variation der Expressionsbedingungen.

Aufgetragen wurden 15 µg Gesamtprotein der löslichen Proteinfractionen. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2 (1:20.000). Eine Bande für die hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa detektiert.

Bei der Analyse der löslichen Proteinfractionen wurden verschiedene Banden detektiert (s. Abbildung 2.14). Bei allen DDAH-2-bildenden Zellen wurden zwei deutliche

Banden bei ca. 35 kDa und 37 kDa detektiert und schwache Banden für Proteine bei ca. 30 kDa und 60 kDa nachgewiesen. Die Proteinbanden bei ca. 37 kDa und 60 kDa tauchten auch bei den Leerplasmid-transformierten Zellen auf. Diese Banden konnten somit *E. coli*-eigenen Proteinen zugeordnet werden, die nicht spezifisch nachgewiesen wurden. Bei dem ca. 35 kDa großen Protein handelte es sich um das hDDAH-2-Fusionsprotein, für das ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa errechnet wurde.

Die 2fach His-*tag* hDDAH-2 wurde unter allen gewählten Bedingungen gebildet. Der Nachweis von Protein in Proben ohne IPTG-Zusatz, deutete auf eine basale Proteinbildung hin. Da die stärkste Bande für das Protein bei 30 °C und 1 mM IPTG nachgewiesen wurde, erfolgte das *scale-up* der Herstellung bei diesen Bedingungen.

Für die Affinitätschromatographie (s. 2.3.2.1.1) wurde die lösliche Proteinfraction von Zellen einer 800 ml Großkultur, die für 6 h bei 30 °C Protein gebildet hatten, isoliert. Das Cytosol wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit 600 µl Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert. Die Matrix wurde nach Laden der Säule mit je 10 Bettvolumina (BV) imidazolfreiem Puffer und Puffer mit 10 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit je 5 BV Puffer mit 100 und 200 mM Imidazol. Es wurden Proben gleichen Proteingehaltes von allen Fraktionen der Reinigung und der Präparation der Proteinfractionen (s. 2.3.3.1.5) hergestellt und per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (s. Abbildung 2.15).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

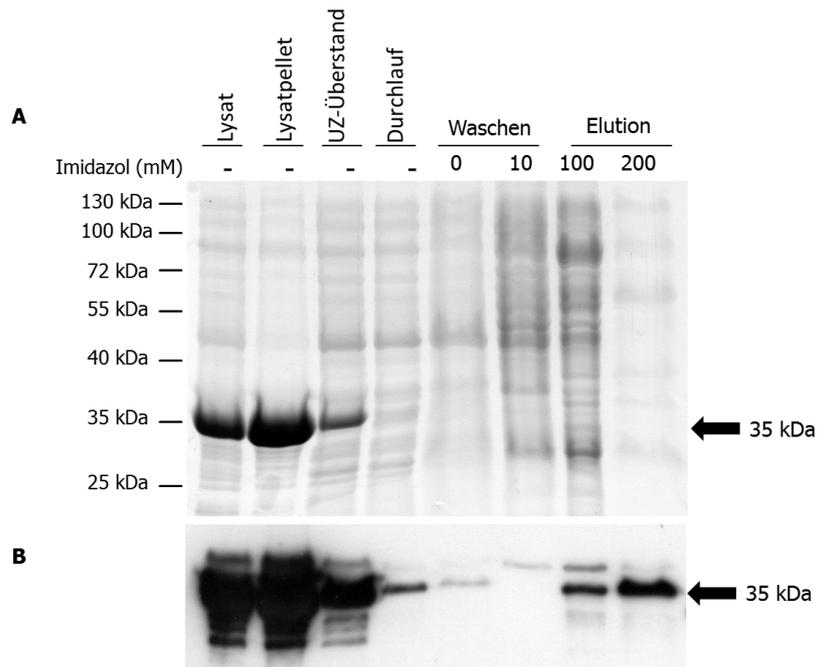


Abbildung 2.15: Analyse der 2fach His-tag hDDAH-2-Reinigung an Ni²⁺-NTA.

SDS-Analyse (**A**) und Western Blot (**B**) von 12 µg Gesamtprotein aller Fraktion. Die Detektion der hDDAH-2 erfolgte im Blot mit einem Antikörper gegen DDAH-2 (1:20.000) bei ca. 35 kDa.

Bei der SDS-Analyse konnte das Fusionsprotein klar im Lysat, Lysatpellet und dem UZ-Überstand nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.15). In den Fraktionen der Reinigung konnte keine Bande für das DDAH-2-Fusionsprotein identifiziert werden. Zudem wiesen nahezu alle Fraktionen das gleiche Proteinstreifenmuster, mit einer leichten Anreicherung der Wirtsproteine im ersten Eluat, auf. Daher konnte kein hDDAH-2-Fusionsprotein gereinigt werden.

Im Western Blot wurden wie erwartet starke Banden für 2fach His-tag hDDAH-2 im Lysat, im Pellet und der löslichen Proteinfraction nachgewiesen. In den Fraktionen der Reinigung war das Protein dagegen nur relativ schwach detektierbar, was auf eine schlechte Bindung des Proteins an die Matrix hindeutete. Das stärkere Signal des Proteins im Eluat mit 200 mM Imidazol ließ sich nicht mit einer Bande im Ergebnis der SDS-Analyse korrelieren.

Die Wiederholung des gesamten Versuchs lieferte ein vergleichbares Ergebnis. Eine Reinigung der 2fach His-getaggten hDDAH-2 war somit nicht möglich.

2.4.1.5.2 Herstellung einer N-terminal His-GST- und C-terminal His-getagten hDDAH-2

Da alle Versuche mit kleinen His-*tags* an der DDAH-2-Sequenz nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurde ein Versuch mit einem größeren *tag* gemacht. Durch Klonierung der hDDAH-2-DNA in das Plasmid pETM-33 (s. 2.3.7) sollte eine rekombinante hDDAH-2 mit His-GST-*tag* am N-Terminus und His-*tag* am C-Terminus hergestellt werden (s. Abbildung 2.16).

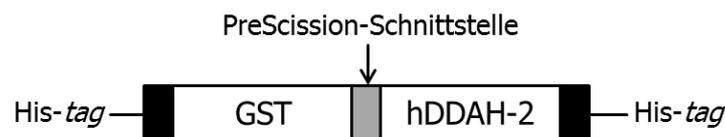


Abbildung 2.16: Schema des GST-hDDAH-2-Fusionsproteins.

Auch hier gab es die Sequenz für eine Proteaseschnittstelle zwischen DDAH-2 und GST-DNA. Der His-GST-tag sollte einerseits eine gute Reinigung ermöglichen und andererseits, mit der Glutathion-S-Transferase-Fusion (GST), die gebildete DDAH-2 stabilisieren (Terpe, 2003).

Die Plasmide DDAH-2pETM-33 und pETM-33 wurden in *E. coli* BL-21(DE3)-Zellen transformiert (s. 2.3.1.10.1). Der Expressionsscreen wurde mit 30 ml-Kulturansätzen bei 25 und 30 °C mit 0-1 mM IPTG für 5 h durchgeführt (s. 2.3.3.1.2). Die Proteinbildung wurde per SDS-PAGE (s. 2.3.2.6) in den Zelllysaten aller Ansätze bestimmt (s. Abbildung 2.17).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

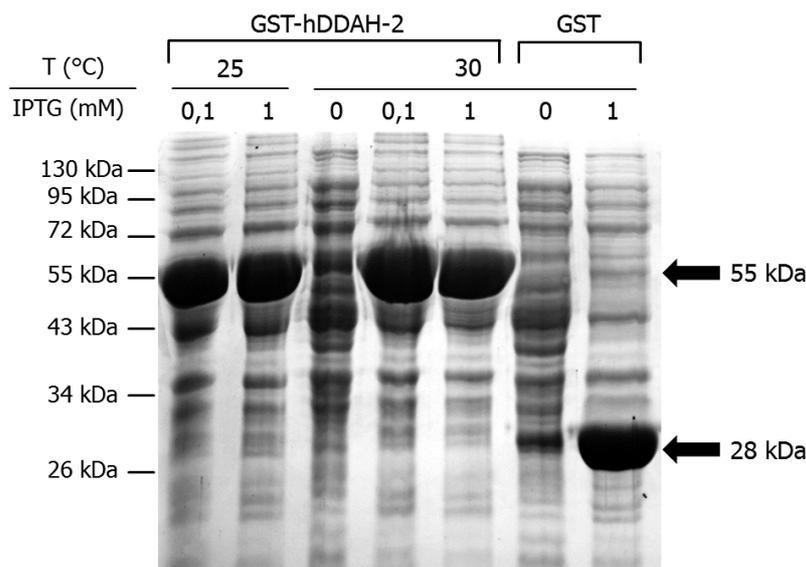


Abbildung 2.17: SDS-Analyse der Bildung N-terminal His-GST-getaggtter hDDAH-2 in *E. coli* bei Variation der Expressionsbedingungen.

Aufgetragen wurden 20 µg Gesamtprotein der Zellysate. Eine Bande für GST war bei einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa sichtbar, eine Bande für das potentielle hDDAH-2-Fusionsprotein bei ca. 55 kDa. GST: Glutathion-S-Transferase.

Bei der Analyse der Leerplasmid-transformierten Zellen wurde eine Bande für His-GST bei ca. 28 kDa im Lysat identifiziert (s. Abbildung 2.17). In Zellen mit IPTG-Zusatz war diese Bande auf Grund der gesteigerten Proteinbildung massiv verstärkt. Ihr Nachweis bei Lysaten ohne Induktion der Proteinexpression deutete auf eine basale Proteinbildung hin.

In den Lysaten von DDAH-2pETM-33-transformierten Zellen wurde bei ca. 55 kDa eine Bande für das GST-hDDAH-2-Fusionsprotein nachgewiesen, die ebenfalls nach Induktion der Proteinbildung deutlich verstärkt war. Für GST-hDDAH-2 wurde ein Molekulargewicht von ca. 59 kDa errechnet. Eine unvollständige Denaturierung konnte auf Grund der Probenvorbereitung (95 °C, 10 min) als Ursache der Detektion der GST-hDDAH-2 bei einem niedrigeren Molekulargewicht ausgeschlossen werden. Die geringere Größe des Fusionsproteins und die fehlende Bindung an Ni²⁺-NTA (Daten nicht gezeigt), deuteten eher auf eine unvollständige Proteinbildung hin. Eine erneute Durchführung des gesamten Versuchs führte für das hDDAH-2-Protein zum selben Ergebnis. Daher wurden die Arbeiten mit diesem Fusionsprotein beendet.

2.4.2 Versuche zur gesteigerten Herstellung löslicher hDDAH-2 in *E. coli* durch Ausnutzung *E. coli*-eigener Chaperone

Es war bekannt, dass bei der Proteinbiosynthese eine Überlastung der Faltungsmechanismen auftreten kann, wenn Fremdproteine in *E. coli* überexprimiert werden (Baneyx, 1999). Das führt zu hohen Anteilen unvollständig oder falsch gefalteter Proteine, die zu unlöslichen *inclusion bodies* agglomerieren und nicht funktionsfähig sind (Baneyx & Mujacic, 2004).

Es wurde daher getestet, ob Faltungsprobleme bei der Proteinsynthese die Ursache für die geringe Bildung löslicher DDAAH-2 waren. Dazu wurde hDDAH-2 als Fusionsprotein mit den molekularen Chaperonen DnaK bzw. GroEL in Anlehnung an die Publikation von (Kyratsous *et al.*, 2009) in *E. coli* hergestellt. Die Hitzeschockproteine DnaK und GroEL sollten im System mit ihren jeweiligen Cochaperonen (DnaK mit DnaJ/GrpE und GroEL mit GroES) die hDDAH-2 nach der Proteinsynthese stabilisieren und ihre korrekte Faltung in die native Struktur fördern.

Mit den verwendeten Plasmiden wurden hDDAH-2-Fusionsproteine mit Chaperon und Linker mit Thrombinschnittstelle am N-Terminus und 6fachen His-*tag* am C-Terminus der hDDAH-2 erzeugt (s. Abbildung 2.18). Die Cochaperone waren auf separaten Plasmiden lokalisiert (s. 5.5 Abbildung 5.7).

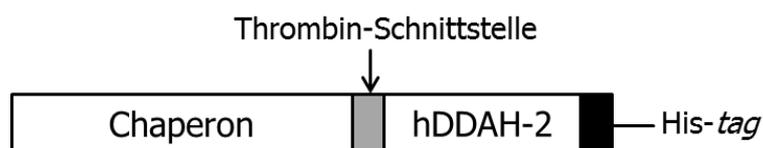


Abbildung 2.18: Schema der hDDAH-2-Chaperonfusionsproteine.

2.4.2.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für hDDAH-2-Chaperonfusionsproteine

Zuerst wurde ermittelt, ob und unter welchen Bedingungen die hDDAH-2-Chaperonfusionsproteine in *E. coli* hergestellt werden können. Dabei wurde in den Screenings der Expressionsbedingungen das Plasmid zur Herstellung des jeweiligen Cochaperons nicht mittransformiert, da dann eine Kultivierung der Zellen mit

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Chloramphenicol nötig gewesen wäre. Chloramphenicol vermindert jedoch die Translation, was möglicherweise die Detektion der Proteinbildung erschwert hätte.

Die Plasmide für die Bildung der Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL-21(DE3)pRep4-Zellen transformiert (s. 2.3.1.10.1). Die Zellen wurden wie unter 2.3.3.1.2 beschrieben in 50 ml Rich-Medium (LB-Medium mit 2 % Glucosezusatz) unter Variation der Temperatur (20-30 °C) und der Induktorkonzentration (0-100 µM IPTG) für 5 h kultiviert. Zusätzlich wurde jeweils das Ursprungsplasmid in Zellen transformiert und eine Kultur pro Leerplasmid bei 30 °C mit 100 µM IPTG induziert. Die Proteinbildung wurde per Western Blot (s. 2.3.2.6) in der löslichen Proteinfraction bestimmt (s. Abbildung 2.19 und Abbildung 2.20).

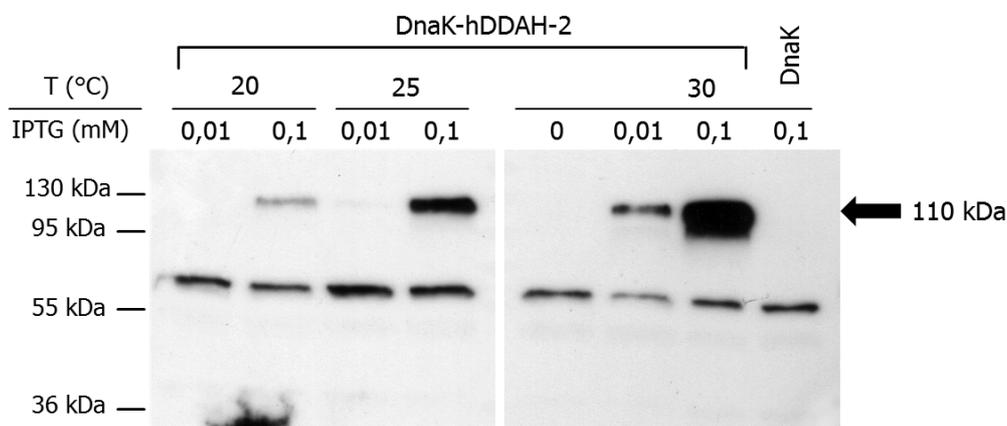


Abbildung 2.19: Western Blot-Analyse der DnaK-hDDAH-2-Bildung in *E. coli* bei Variation der Expressionsbedingungen.

Aufgetragen wurden 18 µg Gesamtprotein der löslichen Proteinfractionen. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2. Eine Bande für die DnaK-hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa detektiert.

Die Proteinherstellung erfolgte in Rich-Medium, da dieses Medium im Vorversuch zu einer gesteigerten Proteinbildung im Vergleich zu dem sonst verwendeten LB-Medium geführt hatte (Daten nicht gezeigt).

Für das DnaK-hDDAH-2-Fusionsprotein wurde ein Molekulargewicht von ca. 102 kDa kalkuliert. Dieses ergab sich aus den Molekulargewichten der hDDAH-2 (29,644 kDa), des DnaK-Chaperons (69,115 kDa; Datenbank: UniProtKB, Eintrag: P0A6Y8), des Linkers mit Thrombinschnittstelle (ca. 1,6 kDa) und des 6fach His-tags (ca. 1 kDa). Mittels Western Blot wurde für das Protein eine Bande bei ca. 110 kDa in der löslichen Proteinfraction aller Ansätze nach Zusatz von 100 µM IPTG detektiert (s. Abbil-

dung 2.19). Der Zusatz von 10 μM IPTG führte nur bei 30 °C zu einer Proteinbildung. Die Bande wurde weder in den Leerplasmid-transformierten Zellen noch bei Zellen ohne Induktorzusatz identifiziert. Daher konnte sie eindeutig der DnaK-hDDAH-2 zugeordnet werden. Eine weitere Bande wurde bei ca. 60 kDa in allen Proben mit etwa vergleichbarer Intensität detektiert. Ihr Nachweis in den Leerplasmid-tragenden Zellen deutete auf ein *E. coli*-eigenes Protein hin, das der Primärantikörper nicht spezifisch in den Zellen detektieren konnte.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Bildung löslicher DnaK-hDDAH-2 möglich war und diese mit steigender Temperatur und IPTG-Konzentration zunahm. Das beste Ergebnis erhielt man bei 30 °C und 100 μM IPTG.

Für das GroEL-hDDAH-2-Fusionsprotein wurde ein Molekulargewicht von ca. 90 kDa kalkuliert. Es setzte sich aus den Molekulargewichten von hDDAH-2, Linker mit Thrombinschnittstelle, 6fach His-*tag* und des GroEL-Chaperons (57,329 kDa; Datenbank: UniProtKB, Eintrag: P0A6F5) zusammen.

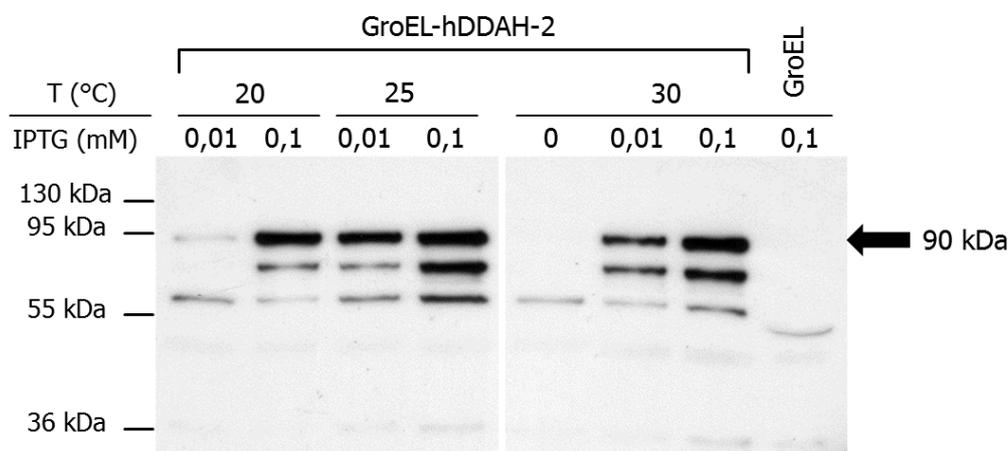


Abbildung 2.20: Western Blot-Analyse der GroEL-hDDAH-2-Bildung in *E. coli* bei Variation der Expressionsbedingungen.

Aufgetragen wurden 18 μg Gesamtprotein der löslichen Proteinfractionen. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2. Eine Bande für die GroEL-hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa detektiert.

Bei der Analyse der löslichen Proteinfractionen von GroEL-hDDAH-2 produzierenden *E. coli*s ergab sich ein ganz anderes Bild. Eine Bildung des Fusionsproteins wurde bei 90 kDa in allen Proben nach Induktion nachgewiesen (s. Abbildung 2.20). Zusätzlich wurden Banden bei ca. 60 kDa und ca. 70 kDa detektiert. Die Signale wurden nicht in

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Leerplasmid-transformierten Zellen nachgewiesen. Bei dem 70 kDa großen Protein könnte es sich um unvollständig gebildetes Fusionsprotein handeln, da die Bande erst nach Induktion der Proteinbildung auftrat.

Die Analyse zeigte, dass die Bildung des Fusionsproteins bei einer Temperatur nur von der IPTG-Konzentration abhing. Es zeigte sich aber auch, dass bei 100 μM IPTG die Proteinbildung bei allen Temperaturen gleich war. Somit konnten für GroEL-hDDAH-2, anders als für DnaK-hDDAH-2, nicht eindeutig optimale Expressionsbedingungen ermittelt werden.

Nachdem die Herstellung der hDDAH-2 mit beiden Chaperonen nachgewiesen werden konnte, wurden Versuche zur Herstellung mit dem jeweiligen Cochaperon gemacht. Es wurde eine gesteigerte Bildung löslicher DDAH-2 erwartet, da das Cochaperon sein zugehöriges Chaperon aktiviert und so den positiven Effekt auf die Proteinfaltung ermöglicht.

Für den Versuch wurden jeweils das Plasmid für die Bildung des Fusionsproteins und für das zugehörige Cochaperon in dieselben Zellen transformiert (s. 2.3.1.10.1). Die Proteinbildung erfolgte in 50 ml Kulturen bei 25 und 30 °C nach Induktion mit 100 μM IPTG für 5 h. Die Proteinbildung wurde per Western Blot in der löslichen Proteinfraktion bestimmt und mit der DDAH-2-Bildung von Zellen ohne gleichzeitige Bildung des Cochaperons verglichen (s. Abbildung 2.21).

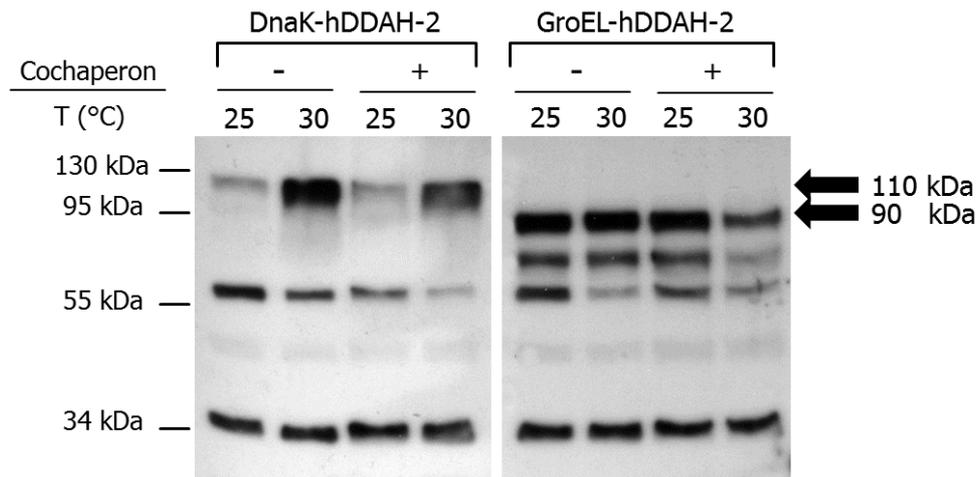


Abbildung 2.21: Western Blot-Analyse der Herstellung der hDDAH-2-Chaperon-fusionsproteine mit jeweiligem Cochaperon in *E. coli*.

Aufgetragen wurden 18 µg Gesamtprotein der löslichen Proteinfractionen. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2 (1:5000). Eine Bande für die GroEL-hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa detektiert, eine Bande für DnaK-hDDAH-2 bei ca. 110 kDa.

Bei der Analyse der löslichen Proteinfractionen waren die Proteinbanden für DnaK-hDDAH-2 (ca. 110 kDa) bzw. GroEL-hDDAH-2 (ca. 90 kDa) bei gleichzeitiger Bildung des Cochaperons nicht stärker ausgeprägt (s. Abbildung 2.21). Bei 30 °C war die DDAH-2-Bildung bei Expression des Cochaperons im Vergleich zum Ansatz ohne sogar vermindert. Ansonsten entsprachen die Ergebnisse der Proteinausbeute in Abhängigkeit von Temperatur und IPTG-Konzentration denen der ersten Screens.

Zusätzlich zu den bereits bekannten Proteinen mit ca. 60 kDa bzw. 70 kDa wurde noch ein ca. 36 kDa großes Protein in allen Proben nicht spezifisch detektiert. Dieses ließ sich später auch in den Leerplasmid-transformierten Zellen nachweisen und einem *E. coli*-eigenen Protein zuordnen (s. Abbildung 2.22 B).

Insgesamt wurde die Bildung löslicher hDDAH-2 durch Coexpression des gesamten Chaperonsystems gegenüber dem einzelnen Fusionsprotein nicht verbessert. Damit sprachen die Ergebnisse gegen Faltungsstörungen als Ursache der bisherigen Probleme bei der DDAH-2-Herstellung in *E. coli*. Da die Herstellung der hDDAH-2 im gesamten Chaperonsystems der Bildung des einzelnen Fusionsproteins nicht überlegen war, wurden alle weiteren Versuche mit dem einzelnen Fusionsprotein durchgeführt.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Zuletzt wurde der Einfluss der Expressionsdauer auf die Proteinbildung untersucht. Dazu wurden für die Bildung des jeweiligen Fusionsproteins bzw. des Chaperons alleine je 50 ml Zellkulturen bei 30 °C für 6-24 h nach Induktion der Proteinherstellung mit 100 µM IPTG kultiviert. Die Proteinbildung wurde per SDS-Page (s. 2.3.2.5) in den Zellysaten und per Western Blot (s. 2.3.2.6) in der löslichen Proteinfraction bestimmt (s. Abbildung 2.22).

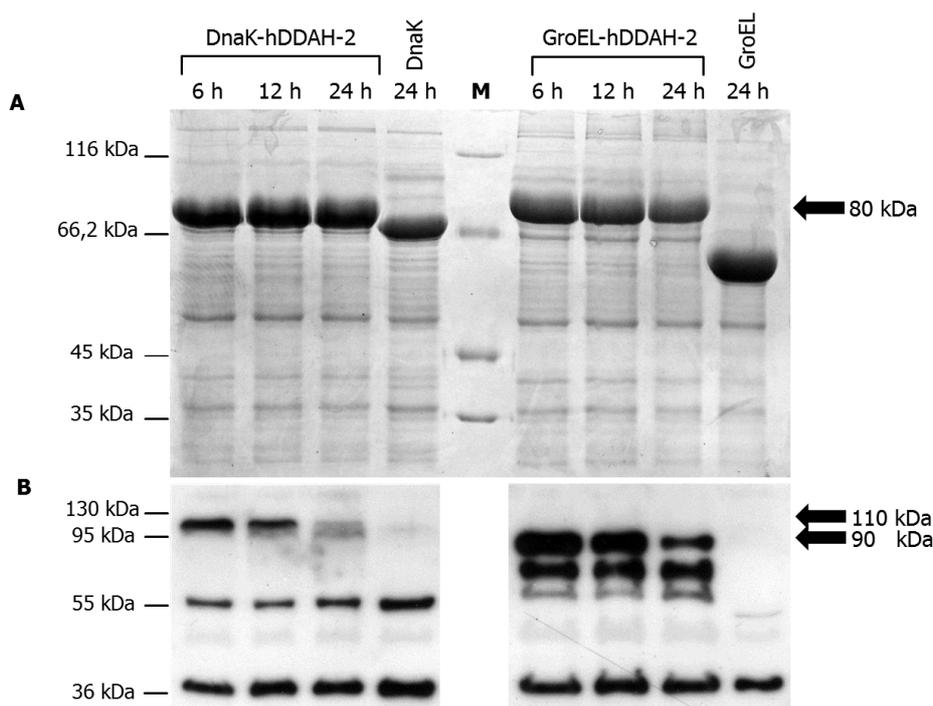


Abbildung 2.22: Analyse der hDDAH-2-Chaperonfusionsprotein-Bildung in *E. coli* in Abhängigkeit von der Herstellungsdauer.

A: SDS-Analyse von 10 µg Gesamtprotein der Lysate. Es wurden Banden einer starken Proteinbildung für DnaK bei ca. 67 kDa, für GroEL bei ca. 60 kDa und für Fusionsproteine bei ca. 80 kDa detektiert.

B: Western Blot von 15 µg Gesamtprotein der löslichen Proteinfractionen. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2. Eine Bande für die GroEL-hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa detektiert, eine Bande für DnaK-hDDAH-2 bei ca. 100 kDa.

Bei der Untersuchung des Zeiteinflusses auf die DDAH-2-Bildung wurden erstmals Zellysate untersucht. Dabei wurde für DnaK eine Bande bei ca. 66kDa und für GroEL eine Bande bei ca. 60 kDa nachgewiesen (s. Abbildung 2.22 A). Für die Fusionsproteine ließen sich jeweils starke Banden bei ca. 80 kDa detektieren. Diese lagen deutlich unter den erwarteten Molekulargewichten von ca. 102 kDa für DnaK-hDDAH-2 und ca. 90 kDa für GroEL-hDDAH-2. Das Ergebnis deutete auf die unvollständige Bil-

dung von Fusionsproteinen hin. Dabei schien besonders die DnaK-hDDAH-2-Bildung nur kurz hinter der Chaperonsequenz abzurechnen. Der Molekulargewichtsunterschied zwischen GroEL und dem Fusionsprotein war deutlich größer. Von einer vollständigen Bildung der GroEL-hDDAH-2 konnte aber nach der SDS-Analyse auch nicht ausgegangen werden. Zusätzlich ließ sich noch eine Bande für potentiell unvollständig gebildetes GroEL-hDDAH-2 bei ca. 66 kDa detektieren. Sie war nicht in den Leerplasmid-Zellen nachweisbar, korrelierte aber mit der ca. 70 kDa großen unbekannten Bande im Blot.

Mit der Analyse der Lysate konnten somit keine Unterschiede bei der Proteinbildung in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt werden. Daher wurde die cytosolische Proteinfraction untersucht (s. Abbildung 2.22 B), in der die jeweiligen Chaperonfusionsproteine als Vollängenproteine nachgewiesen werden konnten.

Die Signale für GroEL-hDDAH-2 waren viel stärker als für DnaK-hDDAH-2, was einen Hinweis auf eine stärkere Proteinbildung darstellte. Außerdem wurde eine Reduktion der Menge des jeweils detektierten Fusionsproteins nach einer Expressionszeit von mehr als 6 h nachgewiesen. Die Expressionsdauer wurde daher nachfolgend nicht länger als 6 h gewählt.

2.4.2.2 Native Reinigung des GroEL-hDDAH-2-Fusionsproteins aus der cytosolischen Fraktion von *E. coli*

Reinigungsversuche wurde nur für GroEL-hDDAH-2-Protein durchgeführt, da nur dieses Protein ausreichend als Vollängenprotein hergestellt wurde. Die Reinigung erfolgte in Anlehnung an die zuvor ermittelte Methode zur nativen Reinigung des hDDAH-2-Fusionsproteins (s. 2.4.1.2).

Für das *scale-up* der GroEL-hDDAH-2-Herstellung wurden transformierte *E. colis* in 800 ml RM-Medium bei 30 °C für 6 h nach Zusatz von 100 µM IPTG kultiviert (s. 2.3.3.1.3). Anschließend wurden die Zellen per *French*[®] *Press* aufgeschlossen (s. 2.3.3.1.4) und die verschiedenen Proteinfractionen gewonnen.

Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe des C-terminalen His-*tags* per Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aus der cytosolischen Proteinfraction gereinigt (s. 2.3.2.1.1). Dafür wurde das Protein über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C an 500 µl Matrix gebunden. Die Matrix wurde anschließend mit 10 Bettvolumina (BV)

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

imidazolfreiem Puffer gewaschen. Weitere Waschschriffe erfolgten mit 6 BV Puffer mit 10 mM Imidazol und je 4 BV Puffer mit 20 mM bzw. 50 mM Imidazol. Die Proteine wurden mit je 2 BV Puffer mit 100, 200 und 400 mM Imidazol eluiert. Der Proteingehalt aller Proben wurde ermittelt (s. 2.3.2.4.1) und alle Fraktionen der Reinigung per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (s. Abbildung 2.23).

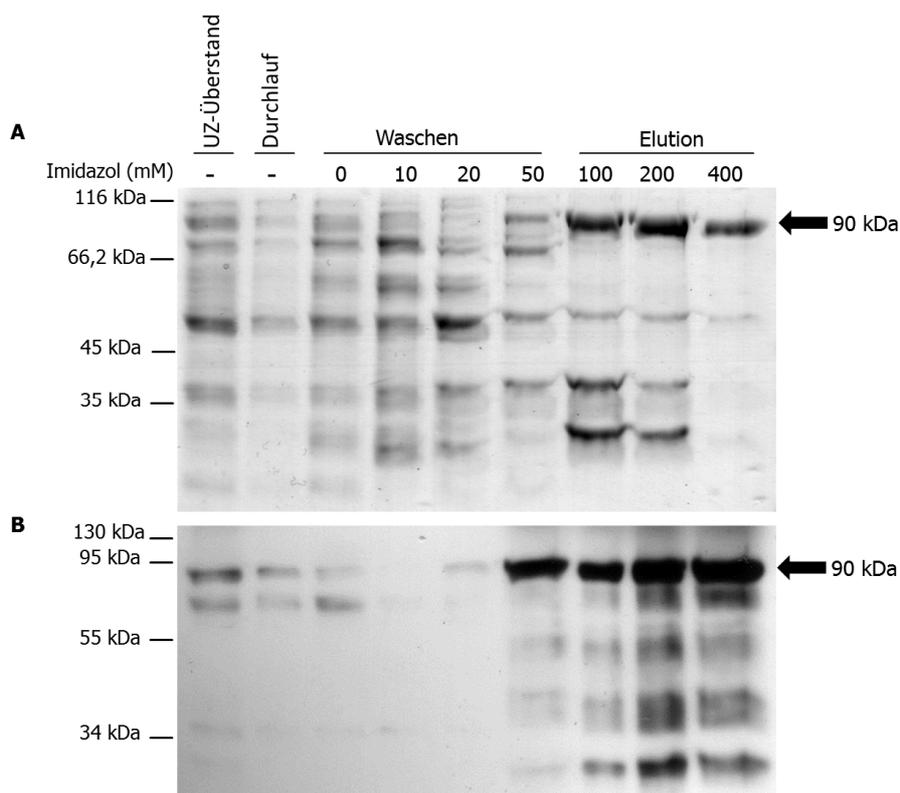


Abbildung 2.23: Analyse der GroEL-hDDAH-2-Reinigung an Ni²⁺-NTA.

SDS-Analyse (A) und Western Blot (B) von allen Fraktionen der Reinigung. Es wurden 9 µg Gesamtprotein für Überstand, Durchlauf und Waschfraktionen aufgetragen. Von den Eluaten wurden 6 µg für die SDS-Analyse und 3 µg für den Blot aufgetragen. Die Detektion der GroEL-hDDAH-2 erfolgte im Blot mit einem Antikörper gegen DDAH-2 bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa detektiert.

Mit der SDS-PAGE konnte eine deutliche Anreicherung der GroEL-hDDAH-2 in den Eluaten bei ca. 90 kDa gezeigt werden (s. Abbildung 2.23 A). Das Protein war in den Eluaten nur noch gering mit ca. 30, 40 und 50 kDa großen Proteinen verunreinigt. Die 400 mM imidazolhaltige Fraktion enthielt sogar fast reines Fusionsprotein. Mittels Western Blot wurde die Identität des DDAH-2-Fusionsproteins bei 90 kDa bestätigt (s. Abbildung 2.23 B). Es wurden auch noch weitere Banden bei unterschiedlichen Molekulargewichten identifiziert, die von möglichen Abbauprodukten des Fusi-

onsproteins stammen konnten. Sie waren jedoch nur deutlich schwächer als das Fusionsprotein detektierbar. Insgesamt wurden ca. 0,8 mg partiell gereinigte GroEL-hDDAH-2 (Gesamtproteingehalt) aus 800 ml Bakterienkultur gewonnen.

Im Vergleich zu vorherigen Versuchen (s. 2.4.1.2, 2.4.1.4 und 2.4.1.5.1) konnte die DDAH-2-Reinigung hier erstmals erfolgreich durchgeführt werden. Damit waren neue Untersuchungen zur Aktivität der DDAH-2 möglich.

2.4.2.3 Untersuchung der *in vitro* Aktivität des rekombinant hergestellten GroEL-hDDAH-2-Fusionsproteins

Die Enzymaktivität nativ gereinigter GroEL-hDDAH-2 wurde *in vitro* durch Umsetzung der Substrate L-NMMA, ADMA, SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin zu L-Citrullin im Plattenreader-Assay untersucht (s. 2.3.6.2). Kontrollinkubationen mit rekombinant hergestellter hDDAH-1 belegten die korrekte Durchführung aller Aktivitätsstudien.

Die Aktivitätsanalyse wurde mit zwei verschiedenen Chargen des Fusionsproteins durchgeführt (s. 2.3.6.2.1). Für GroEL-hDDAH-2 wurden die 200 mM bzw. 400 mM imidazolhaltigen Eluate der Reinigung verwendet. Es wurden immer 2 µg Gesamtprotein jeder hDDAH mit 300 µM des jeweiligen Substrats für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die L-Citrullin-Bildung wurde kolorimetrisch detektiert (s. 2.3.6.2.2) und diente als Maß der DDAH-Aktivität (s. Abbildung 2.24). Für jedes Enzym wurden vier Proben pro Substrat parallel auf der Mikrotiterplatte inkubiert und vermessen. Zusätzlich wurden Ansätze ohne Protein als Kontrolle der nicht-enzymatischen Substrathydrolyse und Ansätze ohne Substrat inkubiert, um die nichtenzymatische L-Citrullin-Bildung zu detektieren.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

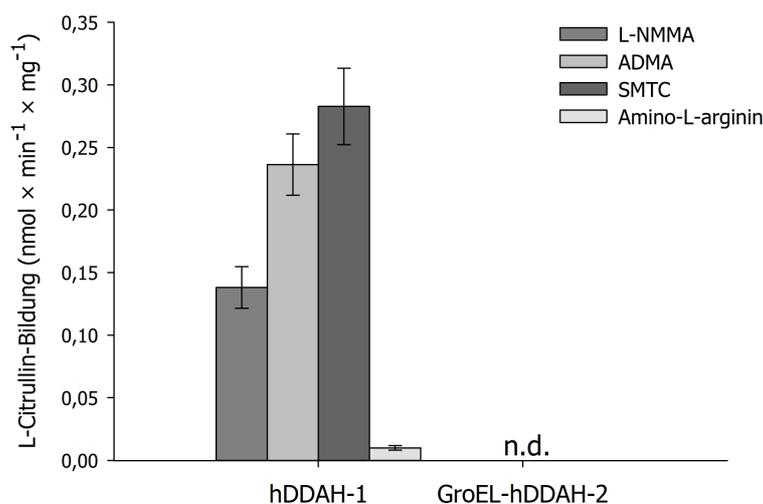


Abbildung 2.24: Substratstudie mit humanen DDAH-Fusionsproteinen.

Gereinigte, rekombinant hergestellte hDDAH-Fusionsproteine (2 µg) wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 150 µl) mit 300 µM des jeweiligen Substrats für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DDAH-Aktivität wurde als L-Citrullin-Bildung in nmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein gemessen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus vier unabhängigen Studien, bei denen vier Proben pro Enzym vermessen wurden. n.d.: Nicht detektierbar (Detektionslimit: 0,02 nmol L-Citrullin min⁻¹ mg⁻¹).

Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurden neben den physiologischen Substraten L-NMMA und ADMA auch SMTC und *N*^ω-Amino-L-arginin als mögliche alternative Substrate für DDAH-Enzyme getestet (Stone *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009).

Alle Substrate wurden von der rekombinant hergestellten hDDAH-1 aber nicht vom GroEL-hDDAH-2-Fusionsprotein zu L-Citrullin umgesetzt (s. Abbildung 2.24). Auch eine Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge auf 4 µg Gesamtprotein und eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min führte zu keiner Substratumsetzung durch GroEL-hDDAH-2 (Daten nicht gezeigt). Es war jedoch mit der Studie erstmals möglich die Umsetzung von *N*^ω-Amino-L-arginin durch eine Säugetier-DDAH nachzuweisen. Außerdem wurde für die rekombinant hergestellte hDDAH-1 ein Anstieg der Substratumsetzung von *N*^ω-Amino-L-arginin über L-NMMA und ADMA zu SMTC detektiert.

Da eine Beeinflussung der hDDAH-2-Aktivität durch den GroEL-Rest nicht ausgeschlossen werden konnte, sollte dieser für weitere Untersuchungen der Enzymaktivität erst eliminiert werden.

2.4.2.4 Abspaltung des GroEL-Restes vom gereinigten hDDAH-2-Fusionsprotein

Auf Grund der Thrombin-Schnittstelle zwischen dem GroEL-Chaperon und der hDDAH-2 (s. 2.4.3 Abbildung 2.18) war eine Abspaltung des Chaperons möglich. Dazu wurde das Protein wie unter 2.4.2.2 beschrieben hergestellt und gereinigt. Bei der Reinigung wurde ein Lysepuffer ohne Benzamidin und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) verwendet, da diese beiden Stoffe Serinproteasen wie Thrombin hemmen.

Für die Abspaltung des Chaperons wurden 200 mM imidazolhaltige Eluate des gereinigten Fusionsproteins mit Thrombin in Anlehnung an die Publikation von Jenny *et al.*, 2003 inkubiert. Zuerst wurde die Zeitabhängigkeit des Thrombinverdaus bei 4 °C untersucht (s. 2.3.2.7.1), um zu ermitteln, ab wann GroEL-freie hDDAH-2 nachweisbar war (s. Abbildung 2.25).

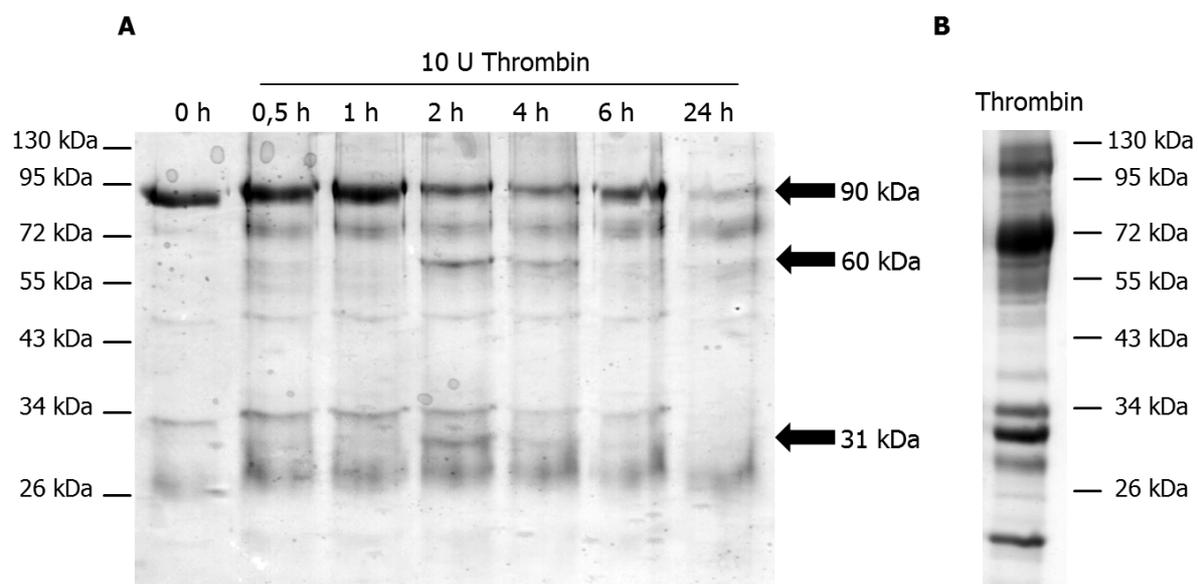


Abbildung 2.25: SDS-Analyse des Thrombinverdaus von GroEL-hDDAH-2 in Abhängigkeit von der Zeit bei 4 °C.

A: SDS-Analyse von 4,5 µg Gesamtprotein der Verdauansätze. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Coomassiefärbung. Eine Bande für die GroEL-hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa detektiert, eine potentielle Bande für hDDAH-2 bei ca. 31 kDa und eine potentielle Bande für GroEL bei ca. 60 kDa. **B:** SDS-Analyse des verwendeten Thrombins.

Bei der SDS-Analyse konnte das Fusionsprotein bei ca. 90 kDa nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.25 A). Die Stärke dieser Bande nahm nach mindestens zweistündiger Inkubation des Fusionsproteins mit Thrombin langsam ab, bis sie nach 24 h nur noch

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

schwach sichtbar war. Parallel dazu sollten Banden bei ca. 31 kDa (hDDAH-2 mit C-terminalem His-*tag*) und bei ca. 60 kDa (GroEL) detektiert werden können. Im Ansatz von zwei und vier Stunden Inkubationszeit waren entsprechende Banden sichtbar, aber nicht wie erwartet mit ansteigender Intensität. Ob sie den Spaltproteinen zugeordnet werden konnten, war unklar. Darüber hinaus wiesen die Proben nach Thrombin-Zugabe noch andere Proteinbanden auf als die Ursprungsprobe des Fusionsproteins.

Für das im Versuch verwendete, gereinigte bovine Thrombin der Firma GE Healthcare wurden bei der SDS-Analyse deutlich mehr als die eine erwartete Bande nachgewiesen (s. Abbildung 2.25 B). Zwei Banden bei ca. 28-30 kDa wirkten sich besonders störend auf den Nachweis von hDDAH-2 mit C-terminalem His-*tag* per SDS-PAGE aus. Der Versuch lieferte dennoch erste Hinweise darauf, dass die Inkubation der GroEL-hDDAH-2 mit Thrombin bei 4 °C zum Abbau des Fusionsproteins führte.

Der erste Versuch wurde bei 4 °C durchgeführt, um das Protein vor Abbau zu schützen und seine potentielle Aktivität zu erhalten. Die Angaben des Herstellers zur Anwendung des Thrombins beschrieben dagegen eine Anwendung bei Raumtemperatur. Daher wurde in einem zweiten Experiment der Abbau von GroEL-hDDAH-2 bei Raumtemperatur im Vergleich zu 4 °C mit 4-20 U Thrombin untersucht (s. 2.3.2.7.2). Die Proben wurden mittels Western Blot (s. 2.3.2.6) analysiert, um die DDAH-2 spezifischer detektieren zu können (s. Abbildung 2.26).

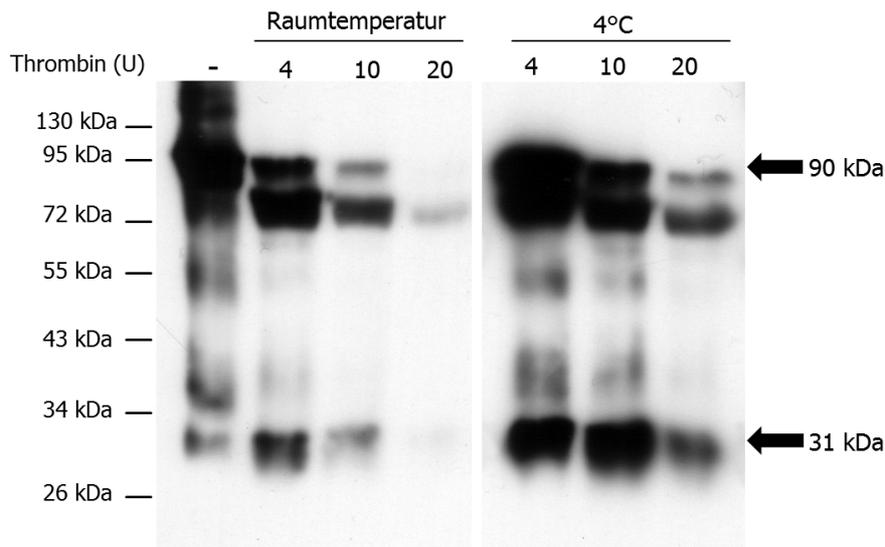


Abbildung 2.26: Western Blot des Thrombinverdaus von GroEL-hDDAH-2 in Abhängigkeit von der Temperatur und der Thrombinmenge.

Aufgetragen wurden 4,5 µg Gesamtprotein der Verdauansätze. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAAH-2. Eine Bande für die GroEL-hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa detektiert.

Im Blot wurde GroEL-hDDAH-2 wie erwartet bei ca. 90 kDa in der Probe ohne Thrombin nachgewiesen (s. Abbildung 2.26). Außerdem wurden noch Banden bei ca. 30, 38 und 55 kDa für mögliche Abbauprodukte des Fusionsproteins detektiert (s. 2.4.2.2). Ohne den Zusatz von Proteaseinhibitoren war das Fusionsprotein anfälliger für den Abbau durch Proteasen.

Das Fusionsprotein wurde mit steigender Thrombinmenge bei Raumtemperatur immer stärker abgebaut bis es bei 20 U Thrombin nicht mehr nachweisbar war. Die bei 4 °C inkubierten Proben lieferten beim Fusionsprotein stärkere Signale als die Ursprungsprobe. Das Protein wurde auch hier mit steigender Thrombinmenge abgebaut, war aber bei 20 U Thrombin noch nachweisbar. Durch die Proteinbande bei ca. 30 kDa in der Ursprungsprobe konnte das Neuauftreten einer Bande für die GroEL-freie hDDAH-2 schwer nachgewiesen werden. Die 30 kDa Bande wurde nur bei Inkubation des Fusionsproteins mit 4 U Thrombin intensiver. Das Signal war aber bei steigender Thrombinmenge wieder vermindert. Die intensivere Detektion des 30 kDa Proteins bei den 4 °C-Proben korrelierte mit der intensiveren Detektion der 90 kDa Bande und bewies nicht die His-*tag*-hDDAH-2-Bildung.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Unter den gewählten Bedingungen ließ sich die nötige Spaltung des Fusionsproteins zu GroEL und His-*tag*-hDDAH-2 auf Grund der Probleme mit der Analytik nicht nachweisen.

2.4.3 Untersuchungen zur Faltung der hDDAH-2 bei Herstellung in *E. coli*

Nach den vorherigen Ergebnissen wurde untersucht, ob die die eukaryotische hDDAH-2 bei Herstellung in Prokaryoten in die native 3D-Struktur gefaltet wird. Nur bei richtiger Faltung des Proteins sind die strukturellen Voraussetzungen für die Enzymaktivität gegeben. Dazu sollten in Anlehnung an die Publikation von Waldo *et al.* C-terminal GFP-getaggte hDDAH-Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt und auf Fluoreszenz untersucht werden (Waldo *et al.*, 1999). GFP ermöglichte als "Faltungsreporter" Aussagen zur hDDAH-2-Faltung über die Fluoreszenz der Fusionsproteine. Mit einem 10fach His-*tag* am C-Terminus des GFP waren die Fusionsproteine einer Reinigung zugänglich (s. Abbildung 2.27). Zudem sollte die postulierte Substratumsetzung für hDDAH-2-GFP, bei nachgewiesener Fluoreszenz, in Aktivitätsstudien gegen hDDAH-1-GFP getestet werden.

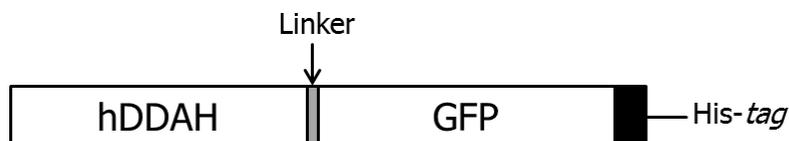


Abbildung 2.27: Schema der hDDAH-GFP-Fusionsproteine.

2.4.3.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für C-terminal GFP-getaggte hDDAH-2

Für die Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen wurde die hDDAH-2-DNA zuerst in das Plasmid pIVEX2.3wGFPC kloniert (s. 2.3.7). Das neu gewonnene Plasmid und das Leerplasmid wurden jeweils in *E. coli* BL-21(DE3)pRep4-Zellen transformiert. Mit DDAH-2pIVEX2.3wGFPC-transformierten Zellen wurden 30 ml Kulturen angeimpft und unter Variation der Temperatur (25-37 °C) und der Induktorkonzentration (0-1 mM IPTG) für 5 h kultiviert (s. 2.3.3.1.2). Mit pIVEX2.3wGFPC-transformierte Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen lysiert, der Proteingehalt der Lysate ermittelt (s. 2.3.2.4.2) und

Proben gleichen Gesamtproteingehalts hergestellt. Von diesen wurde zum einen die Fluoreszenz gemessen (s. Abbildung 2.28) und zum anderen Proben für die SDS-PAGE bei 95 °C hergestellt. Die Proteinbildung wurde per SDS-PAGE und Western-Blot (s. 2.3.2.6) in den Zellysaten aller Ansätze bestimmt (s. Abbildung 2.29).

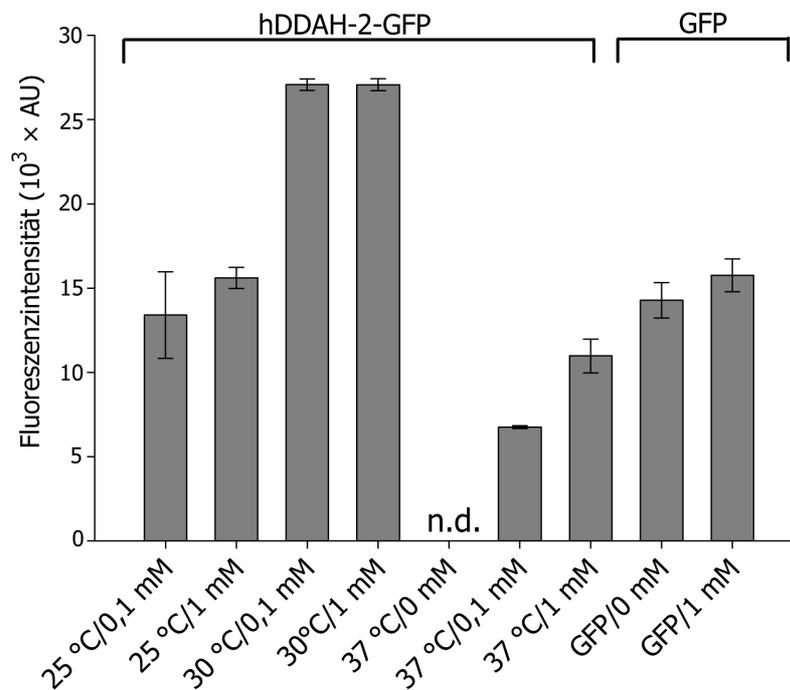


Abbildung 2.28: Fluoreszenzmessung von GFP-Proteinen in *E. coli*-Lysaten.

Für die Fluoreszenzmessung wurden die Proben mit Standard-Lysepuffer bis in den Messbereich verdünnt und vermessen (s.2.3.4.3). Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von zwei unabhängigen Proben die jeweils dreifach vermessen wurden. Die Messwerte der Proben wurden um die Messwerte des Puffers korrigiert. n.d.: Keine Fluoreszenz detektierbar. AU: *arbitrary units*

In den Lysaten konnte unter fast allen Expressionsbedingungen eine Fluoreszenz durch Bildung von GFP oder GFP-Fusionsproteinen gemessen werden (s. Abbildung 2.28). Die höchste Fluoreszenz wurde bei 30 °C in Lysaten von hDDAH-2-GFP-bildenden Zellen ermittelt. Bei 25 und 30 °C war die Fluoreszenzintensität kaum von der IPTG-Menge abhängig. Lediglich bei 37 °C gab es beim Fusionsprotein eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der IPTG-Konzentration. Ohne Zusatz des Induktors war keine Fluoreszenz nachweisbar, was darauf hindeutete, dass kein hDDAH-2-GFP gebildet wurde.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Die GFP-bildenden Zellen wiesen unabhängig vom IPTG-Zusatz eine vergleichbare Fluoreszenzintensität in den Lysaten auf. Diese war vergleichbar mit der Intensität bei 25 °C in Lysaten des Fusionsproteins.

Für die SDS-Analyse wurden die Lysate bei 95 °C vorbehandelt. Nach der Coomassie-Färbung konnte keine Bande für verstärkt gebildete hDDAH-2-GFP identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte vor der Färbung bei der In-Gel-Messung (s. 2.3.4.2) keine Fluoreszenz vom Fusionsprotein oder GFP nachgewiesen werden. Als Ursache des Fluoreszenzverlustes wurde die Hitzebehandlung der Lysate vermutet. Nachfolgend wurden dann alle Proben mittels Western Blot auf DDAH-2-Bildung untersucht.

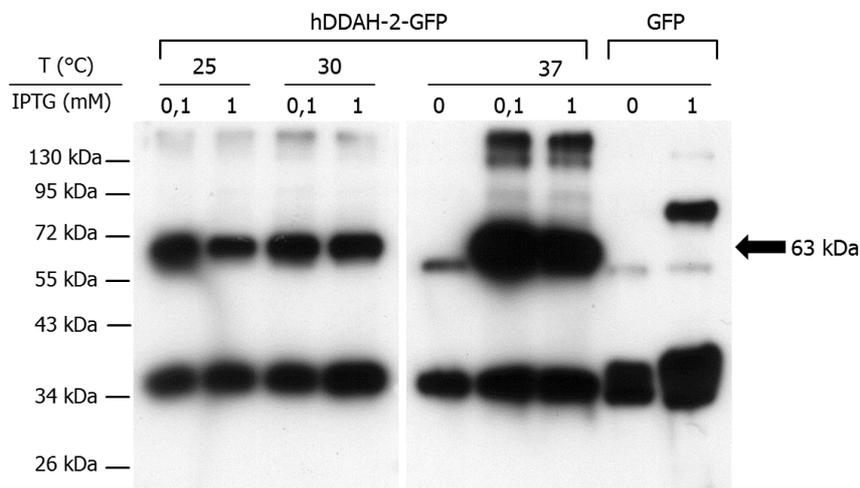


Abbildung 2.29: Western Blot-Analyse der hDDAH-2-GFP-Bildung in *E. coli* bei Variation der Expressionsbedingungen.

Aufgetragen wurden 15 µg Gesamtprotein der Zellysate. Die Detektion der Proteinbildung erfolgte mit einem Antikörper gegen DDAH-2. Eine Bande für die hDDAH-2-GFP wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa detektiert.

Die Analyse der Zellysate mit einem Antikörper gegen humane DDAH-2 führte zur Detektion mehrerer Banden (s. Abbildung 2.29). In allen Proben wurde ein Protein bei ca. 36 kDa stark detektiert. Zusätzlich wurde in einigen Proben ein ca. 60 kDa großes Protein schwächer nachgewiesen. Beide Proteine wurden in den Leerplasmid-transformierten Zellen identifiziert, so dass es sich um Wirtszellproteine handelte, die nicht spezifisch vom Primärantikörper erkannt wurden. Eine starke Bande bei ca. 85 kDa konnte in den GFP-bildenden Zellen nicht zugeordnet werden.

In den Lysaten hDDAH-2pIVEX2.3wGFPc-transformierter *E. coli*s wurde nach IPTG-Zusatz das hDDAH-2-Fusionsprotein bei ca. 63 kDa identifiziert. Das detektierte Molekulargewicht des Fusionsproteins stimmte mit dem aus der DNA-Sequenz kalkulierten überein. Auffällig war, dass die Größe und Intensität der hDDAH-2-GFP-Banden im Blot bei 25 und 30 °C vergleichbar, aber bei 37 °C deutlich erhöht war. Das deutete auf eine stärkere Bildung des Fusionsproteins bei 37 °C hin. Beim Vergleich der Bildung des Fusionsproteins mit der in den Lysaten gemessenen Fluoreszenz fiel auf, dass sie nicht miteinander korrelierten. Das war ein Hinweis darauf, dass die gemessene Fluoreszenz nicht nur vom Fusionsprotein verursacht wurde.

2.4.3.2 Denaturierende Reinigung von hDDAH-2-GFP

Um zu prüfen, ob hDDAH-2pIVEX2.3wGFPc-transformierte *E. coli*s parallel zum Fusionsprotein auch isoliertes GFP bilden, wurde eine denaturierende Reinigung durchgeführt. Diese bietet den Vorteil, dass der His-*tag* leichter für Ni²⁺-NTA zugänglich ist und dass nicht nur cytosolische Proteine gereinigt werden können. Die parallele Bildung von hDDAH-2-GFP und GFP würde die Unterschiede zwischen der zuvor ermittelten Fusionsproteinbildung und der gemessenen Fluoreszenz in den Lysaten erklären.

Für die Reinigung wurden entsprechend transformierte *E. coli*-Zellen in 250 ml LB-Medium bei 37 °C für 5 h nach Zugabe von 0,1 mM IPTG kultiviert. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte wie unter (s. 2.3.2.1.2) beschrieben. Die gewonnenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (s. Abbildung 2.30). Bei der Analyse der Fluoreszenz fiel auf, dass die Fraktionen ab der Waschfraktion nicht mehr fluoreszierten (Daten nicht gezeigt). Dies deutete auf Probleme bei der Stabilität des GFP-Fluorophors hin.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

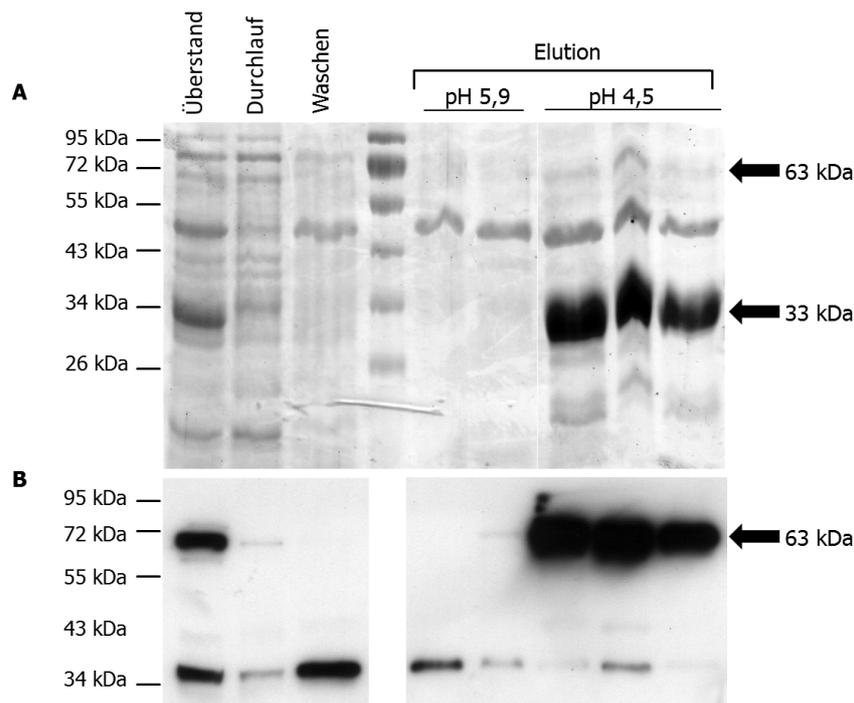


Abbildung 2.30: Analyse der hDDAH-2-GFP-Reinigung an Ni²⁺-NTA.

SDS-Analyse **(A)** und Western Blot **(B)** von allen Fraktionen der Reinigung. Es wurden 7 µg Gesamtprotein für Überstand, Durchlauf und Waschfraktionen aufgetragen. Von den Eluaten wurden 4,5 µg aufgetragen. Die Detektion der hDDAH-2-GFP erfolgte im Blot mit einem Antikörper gegen DDAH-2 bei einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa.

Bei der SDS-Analyse konnte das ca. 63 kDa große hDDAH-2-GFP-Fusionsprotein nur schwach in den Eluaten bei pH 4,5 nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.30 A). Außerdem wurde im Überstand und in den Eluaten bei pH 4,5 eine starke Bande für GFP bei ca. 33 kDa detektiert. Zusätzlich waren die Fraktionen der Reinigung noch mit einigen Banden von Wirtsproteinen verunreinigt. Die hDDAH-2-GFP wurde mit der Methode nicht gereinigt, sondern nur in den Eluaten angereichert.

Die Identität des Fusionsproteins wurde mittels Western Blot nachgewiesen (s. Abbildung 2.30 B). Dabei wurde das Protein hauptsächlich im Überstand und in den Eluaten bei pH 4,5 identifiziert. Darüber hinaus ließ sich noch wie zuvor eine Bande für ein Wirtsprotein bei ca. 36 kDa detektieren (s. 2.4.3.1).

Die SDS-Analyse bewies eindeutig, dass GFP in den Zellen stärker gebildet wurde als das hDDAH-2-Fusionsprotein. Damit ergab sich eine Konkurrenzsituation bei der Proteinherstellung zum Nachteil von hDDAH-2-GFP. Bei näherer Betrachtung der DNA-

sequenz wurden neben dem ATG-Startcodon der hDDAH-2 noch zwei ATG-Codons in der Anfangssequenz des GFP identifiziert (s. Abbildung 2.31).

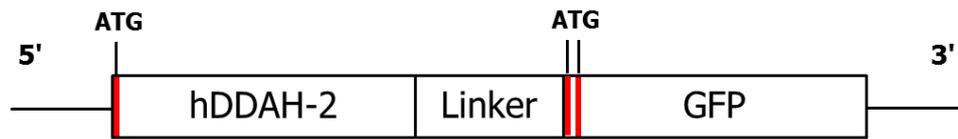


Abbildung 2.31: Schema der DNA-Sequenz des hDDAH-2-GFP-Fusionsproteins.

Dargestellt ist die DNA-Sequenz des Fusionsproteins unterteilt in die DNA-Bereiche der einzelnen Komponenten. Die roten Balken verdeutlichen die Lage der ATG-Codons, die als Startpunkt der Proteinbiosynthese genutzt werden können.

Diese Codons konnten von den Zellen ebenfalls als Startpunkt der Proteinbiosynthese genutzt werden, was zur alleinigen Bildung von GFP führte. Um das zu verhindern sollten die ATGs des GFP per Mutagenese verändert und so als Startcodons eliminiert werden (s. 2.4.3.4).

2.4.3.3 Stabilitätsanalytik von GFP

Nachdem bisher eine Fluoreszenz für GFP bzw. hDDAH-2-GFP weder im SDS-PAGE-Gel noch nach der denaturierenden Reinigung nachweisbar war, musste die Stabilität des GFP-Fluorophors überdacht werden. Da über die Stabilität des GFP, besonders unter denaturierten Bedingungen mit 8 M Harnstoff, nur wenige Studien (Bokman & Ward, 1981; Alkaabi *et al.*, 2005) vorlagen, wurden eigene Daten erhoben. Dabei ging es in erster Linie darum, wie stabil die GFP-Fusionsproteine bei einer nativen Probenaufarbeitung sind und welche Bedingungen für die Reinigung toleriert werden. Daher wurde die Stabilität von GFP in der löslichen Proteinfraction und nicht die des reinen Proteins (s. 2.3.5) untersucht. Es wurden Untersuchungen zur Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur (s. Abbildung 2.32), von der Anzahl der Einfrier-Auftau-Zyklen (s. Abbildung 2.33) und dem pH-Wert (s. Abbildung 2.34) durchgeführt.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

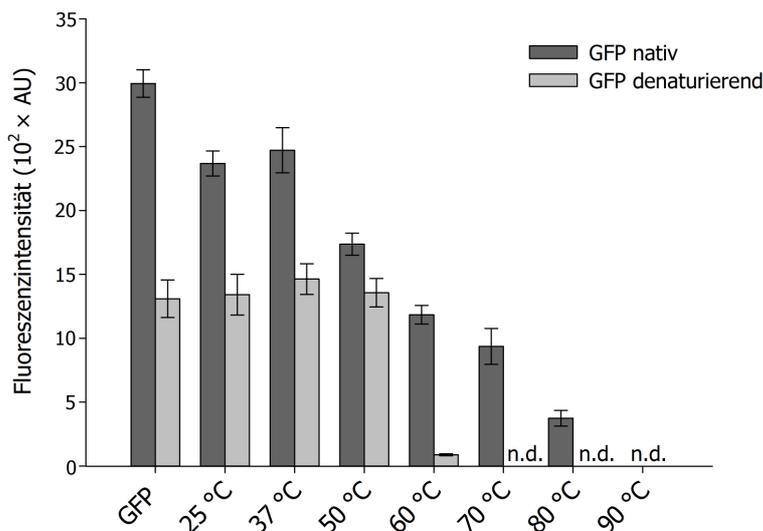


Abbildung 2.32: Messung der GFP-Fluoreszenz der löslichen Proteinfraction in Abhängigkeit von der Temperatur.

Es wurden je zweimal 100 µl pro GFP-haltiger Proteinlösung für 10 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Untersuchungen bei denen zwei unabhängige Proben jeweils dreifach vermessen wurden. Die Messwerte der Proben wurden um die Messwerte der Puffer korrigiert. GFP: Unbehandelte Kontrollen. AU: *arbitrary units*. n.d.: Keine Fluoreszenz detektierbar.

Wurde das GFP-haltige Cytosol unter nativen Bedingungen aufgearbeitet, war ein leichter Verlust der Fluoreszenz bei 25 und 37 °C im Vergleich zur unbehandelten Fraktion nachweisbar (s. Abbildung 2.32). Bis 80 °C nahm die Fluoreszenz dann kontinuierlich ab, bis bei 90 °C keine Fluoreszenz mehr detektierbar war. Hier war die Proteinstruktur thermisch denaturiert und keine Fluoreszenz mehr möglich. Damit konnte nun der Fluoreszenzverlust der bei 95 °C für die SDS-PAGE behandelten Proben erklärt werden (s. 2.4.3.1). Die weitere Herstellung von SDS-Proben GFP-haltiger Proteine erfolgte daher bei 37 °C für 30 min.

Andere Ergebnisse lieferte die Analyse GFP-bildender Zellen bei Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen. Hier war die Fluoreszenz in der löslichen Proteinfraction bis 50 °C stabil. Bei höheren Temperaturen nahm sie drastisch ab und war ab 70 °C nicht mehr nachweisbar. Im Vergleich zum nativen GFP-haltigen Cytosol ((2993,49 \pm 107,98) AU) war die Fluoreszenz bei denaturiert aufgearbeitetem GFP-haltigen Cytosol um ca. 50 % vermindert ((1309,41 \pm 147,33) AU).

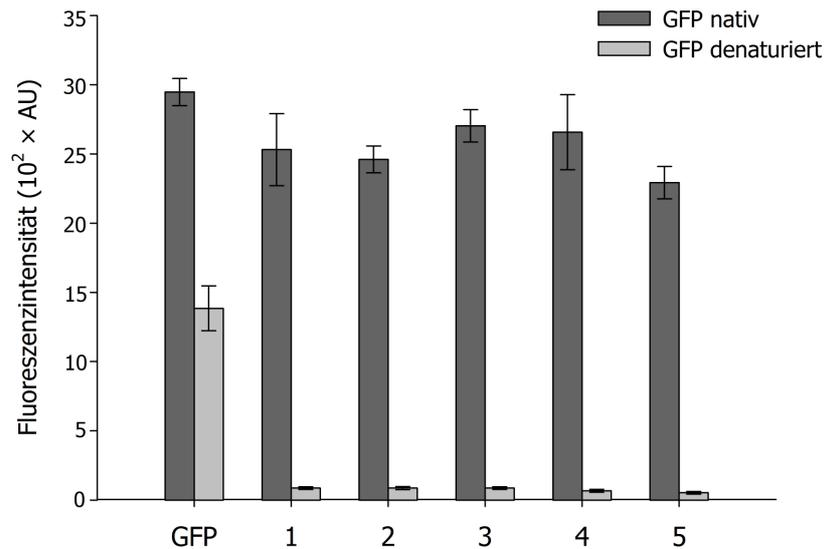


Abbildung 2.33: Messung der GFP-Fluoreszenz der löslichen Proteinfraction in Abhängigkeit von der Zahl der Einfrier-Auftau-Zyklen.

Es wurden je zweimal 1 ml GFP-haltige Proteinlösung eingefroren. Nach Auftauen der Lösung wurde eine Probe genommen und vermessen. Die Zahlen geben die Anzahl der Einfrier/Auftau-Zyklen an. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Untersuchungen bei denen zwei unabhängige Proben jeweils dreifach vermessen wurden. Die Messwerte der Proben wurden um die Messwerte der Puffer korrigiert. GFP: Unbehandelte Kontrollen. AU: *arbitrary units*.

Im Vergleich zur unbehandelten GFP-Fraktion war die Fluoreszenz des nativ aufgearbeiteten GFP-haltigen Cytosols auch bei wiederholten Einfrier-Auftau-Prozessen nur geringfügig vermindert (s. Abbildung 2.33). Im Gegensatz dazu wurde die Fluoreszenz bei denaturiert aufgearbeitetem GFP-haltigen Cytosol bereits ab dem ersten Einfrier-Zyklus um mehr als 90 % gesenkt ((1384,95 \pm 162,71) AU unbehandelt versus (86,19 \pm 9,44) AU nach 1. Zyklus).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

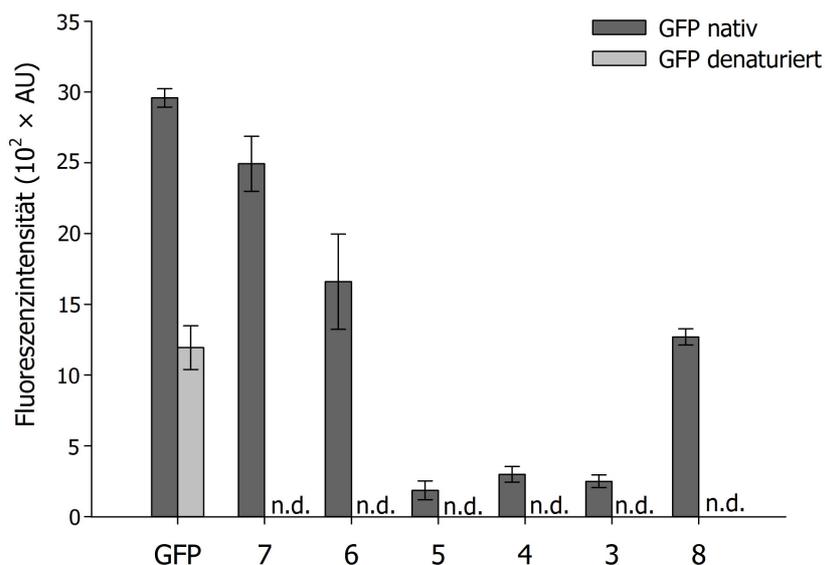


Abbildung 2.34: Messung der GFP-Fluoreszenz der löslichen Proteinfraction in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Es wurden je zweimal 2 ml GFP-haltige Proteinlösung untersucht. Der pH-Wert wurde unter Zusatz von Salzsäure nacheinander auf 7, 6, 5, 4 und 3 abgesenkt. Bei jeder pH-Stufe wurden 150 µl Probe gezogen. Am Ende wurde der pH-Wert mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8 angehoben. Die Zahlen geben den jeweiligen pH-Wert an. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei Untersuchungen bei denen zwei unabhängige Proben jeweils dreifach vermessen wurden. Die Messwerte der Proben wurden um die Messwerte der Puffer korrigiert. GFP: Unbehandelte Kontrollen. AU: *arbitrary units*. n.d.: Keine Fluoreszenz detektierbar.

Beim nativen GFP-haltigen Cytosol sank die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Probe bis pH 6 um knapp 50 % ab (s. Abbildung 2.34). Wurde der pH-Wert noch weiter erniedrigt, lag die Restfluoreszenz bei pH 3 bei ca. 10 % des Ausgangswertes ((249,71 \pm 45,19) AU) versus (2957,74 \pm 65,26) AU bei der Ursprungsprobe). Mit der Anhebung des pH-Wertes auf 8 konnte ca. 42 % der Fluoreszenz der unbehandelten Probe wiederhergestellt werden ((1270,08 \pm 57,50) AU bei pH 8 versus (2957,74 \pm 65,26) AU bei der Ursprungsprobe).

Die Fluoreszenz von GFP in denaturiert aufgearbeitetem Cytosol erlosch, sobald der pH-Wert unter 8 sank. Eine Renaturierung der Struktur und damit der Fluoreszenz durch Anhebung des pH-Wertes auf pH 8 war nicht möglich. Damit konnte geklärt werden, warum die hDDAH-2-GFP-Proben nach der denaturierenden Reinigung (pH < 6) keine Fluoreszenz mehr zeigten.

Es konnte eine deutlich höhere Stabilität der Fluoreszenz und damit der Struktur von GFP in nativ aufgearbeiteter cytosolischer Proteinlösung ermittelt werden, als unter denaturierenden Bedingungen.

2.4.3.4 Herstellung von mutierten GFP-hDDAH-Fusionsproteinen

Nachdem die Stabilitätsfragen geklärt waren, wurden per *in vitro* Mutagenese (s. 2.3.1.13) die ATGs aus der Anfangssequenz des GFP in den allen pIVEX2.3wGFPC-Plasmiden entfernt (s. Abbildung 2.35).

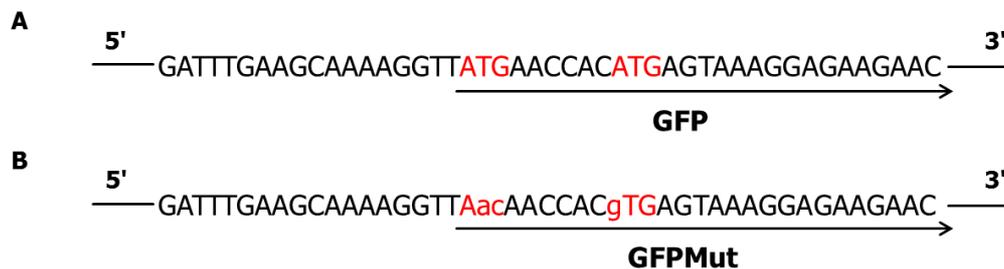


Abbildung 2.35: Schematische Darstellung der Startsequenz von GFP und der GFP-Mutante.

A: Teil der Ursprungssequenz des GFP mit den rotmarkierten ATG-Codons. **B:** Teil Sequenz des GFPMut nach Einführung der Mutationen in den ehemaligen ATG-Coden. Die mutierten Basen sind klein geschrieben.

So entstanden Plasmide zur Herstellung von GFPMut sowie hDDAH-1-GFPMut und hDDAH-2-GFPMut. Bei den Plasmiden zur Herstellung der hDDAH-GFPMut-Proteine sollte es durch diesen Eingriff nicht mehr zur Bildung von GFP alleine kommen.

Nach Transformation der Plasmide in Expressionszellen wurden pro Plasmid 600 ml Ansätze der Zellen bei 30 °C (GFPMut) bzw. 37 °C für 5 h nach Zugabe von 0,1 mM IPTG kultiviert. Die Zellen wurden nach der Ernte per *French*[®] *Press* lysiert (s. 2.3.3.1.4) und die Proteinfractionen gewonnen (s. 2.3.3.1.5). Nach Bestimmung des Proteingehalts (s. 2.3.2.4.2) wurden Proben mit gleichem Gesamtproteingehalt per SDS-PAGE (s. Abbildung 2.36) und Western Blot (s. Abbildung 2.37) auf die Bildung von GFP-Mut und hDDAH-GFPMut untersucht.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

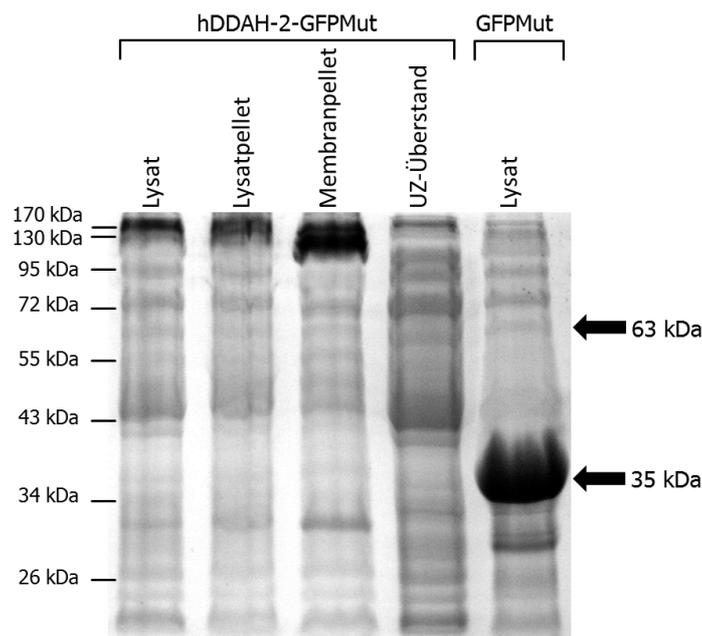


Abbildung 2.36: SDS-Analyse der Proteinfractionen von hDDAH-2-GFPMut und GFPMut-bildenden *E. coli*.

Aufgetragen wurden 16 µg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion. Eine Bande für GFPMut wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa detektiert.

Zuerst wurde eine SDS-Analyse der Proteinfractionen von hDDAH-2-GFPMut und des Lysats von GFPMut-bildenden Zellen durchgeführt. Dabei konnte in keiner der Fraktionen DDAH-2pIVEX2.3wGFPcMut-transformierter Zellen eine verstärkte Bildung des hDDAH-2-Fusionsproteins bei ca. 63 kDa nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.36). Es wurde in den Fraktionen auch keine Bande für GFP-Mut identifiziert. Diese Bande wurde deutlich im Lysat der GFPMut-bildenden Zellen bei ca. 35 kDa detektiert. Durch Mutation der ATGs am Anfang der GFP-Sequenz startete die Proteinsynthese nun vor dem HA-*tag* (s. 2.3.7 Abbildung 2.3 A). Dadurch wurde das Protein vollständig mit Linker und *tag* gebildet und war etwas größer als zuvor GFP ohne Reste (ca. 33 kDa, s. 2.4.3.2).

Aus den Ergebnissen ließ sich schließen, dass die Mutation der GFP-Sequenz bei den DDAH-Fusionsproteinen erfolgreich die alleinige Bildung von GFPMut verhindert. Damit war das Ziel erreicht, eine Konkurrenzreaktion bei der Proteinbildung zu vermeiden. Allerdings führte es laut SDS-Analyse nicht, wie erwartet, zu einer verstärkten Bildung von hDDAH-2-GFPMut.

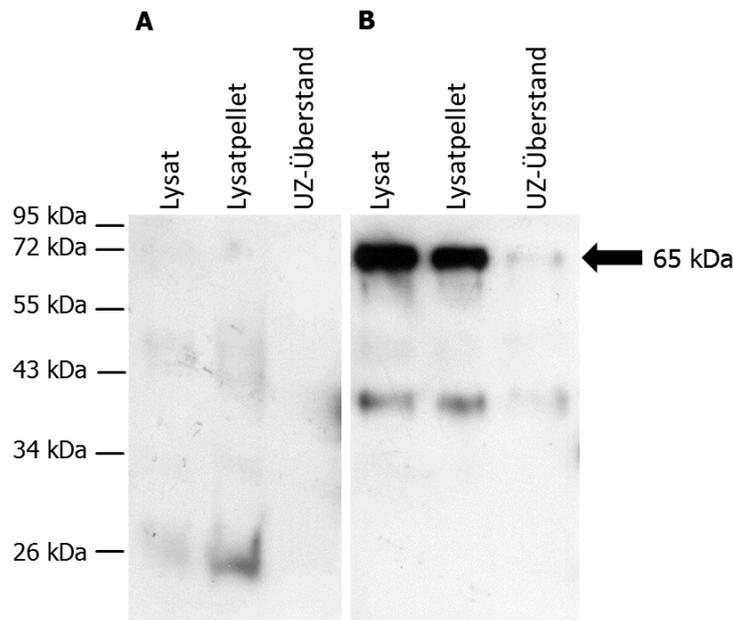


Abbildung 2.37: Western Blot-Analyse der Proteinfractionen von *E. coli*, die GFP-getaggte hDDAH-Proteine bilden.

Es wurden 12 µg Gesamtprotein jeder Fraktion pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-1-Antikörper (1:50.000; **Blot A**) bzw. Anti-DDAH-2-Antikörper (1:10.000; **Blot B**) entwickelt. Eine Bande für hDDAH-2-GFPMut wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa detektiert.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteinfractionen der DDAH-GFPMut-Fusionsproteine per Western Blot auf Proteinbildung untersucht. Dabei konnte keine Bande für hDDAH-1-GFPMut identifiziert werden (s. Abbildung 2.37 A). Auch eine Entwicklung der Proben mit 5fach höherer Antikörpermenge und eine Wiederholung der Proteinherstellung führten zu keinem anderen Ergebnis. Das Protein konnte aus unbekannter Ursache nicht in *E. coli* gebildet werden.

Bei Zellen, die hDDAH-2-GFPMut bilden sollten, konnte das Protein bei ca. 65 kDa im Lysat, Lysatpellet und sehr schwach in der cytosolischen Fraktion detektiert werden (s. Abbildung 2.37 B). Dies bedeutete, dass das Protein zwar gebildet wurde, aber kaum in löslicher Form vorlag. Die Wiederholung der Proteinherstellung und der Analyse lieferte für hDDAH 2-GFPMut das gleiche Ergebnis.

2.4.4 Rekombinante Herstellung N-terminal His-getaggtter hDDAH-2 in Anlehnung an Leiper *et al.*, 1999

Nachdem alle eigenen Versuche zur rekombinanten Herstellung aktiver hDDAH-2 gescheitert waren, wurde die Herstellung des Proteins nach der Publikation von Leiper

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

et al., 1999 durchgeführt. Die Publikation beschrieb als einzige die erfolgreiche Herstellung aktiver hDDAH-2 als Fusionsprotein mit N-terminalem His-*tag* und Linker in *E. coli* (im folgenden hDDAH-2JL genannt). Da die Publikation keine Methode für die Reinigung des Proteins enthielt, sollte diese etabliert werden. Außerdem wurde die mit dem Plasmid DDAH-2pQE30 herstellbare hDDAH-2 bezüglich der Aktivität mit der hDDAH-2JL verglichen.

2.4.4.1 Vergleichende Herstellung und Untersuchung N-terminal His-getaggtter hDDAH-2

Im ersten Versuch wurden hDDAH-2JL und hDDAH-2 nach der Vorschrift von Leiper *et al.*, 1999 in *E. coli* hergestellt und die Aktivität untersucht. Die Art der verwendeten Expressionszellen war in der Publikation nicht definiert. Da die Gruppe in anderen Publikationen (Murray-Rust *et al.*, 2001; Leiper *et al.*, 2002) mit *E. coli* BL-21(DE3)-Zellen arbeitete, wurden diese auch für die Versuche verwendet.

Zuerst wurde die DNA für die hDDAH-2 in das Plasmid pProEx-Hta kloniert (s. 2.3.7). Dann wurden die Plasmide DDAH-2pProEx-Hta und DDAH-2pQE30 jeweils in *E. coli* BL-21(DE3)-Zellen transformiert. Pro Plasmid wurden 800 ml-Kulturansätze der Zellen bei 25 °C für 2 h nach Induktion der Proteinbildung mit 1 mM IPTG kultiviert (s. 2.3.3.1.3). Anschließend wurden die Zellen per *French*[®] *Press* lysiert (s. 2.3.3.1.4). Ein Teil des Lysats wurde bei 54.000 × *g*, 4 °C für 20 min zentrifugiert, um den Überstand und das Pellet zu gewinnen. Nach Bestimmung des Proteingehalts (s. 2.3.2.4.2) wurden Proben jeder Fraktion mit gleichem Gesamtproteingehalt per Western Blot (s. 2.3.2.6) auf DDAH-2-Bildung untersucht (s. Abbildung 2.38).

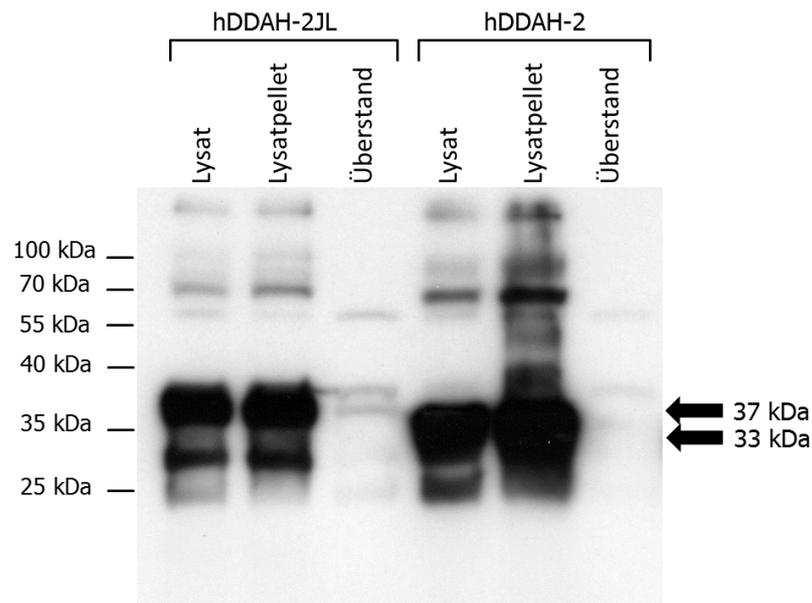


Abbildung 2.38: Western Blot-Analyse der Proteinfractionen von *E. coli*, die verschiedene His-getaggte hDDAH-2-Proteine bilden.

Es wurden 16 µg Gesamtprotein jeder Fraktion aufgetragen und mit Anti-DDAH-2-Antikörper (1:20.000) entwickelt. Eine Bande für hDDAH-2JL wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa, eine Bande für hDDAH-2 bei ca. 33 kDa detektiert.

Bei der Analyse der Zellfraktionen wurde hDDAH-2JL bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa im Lysat, im Pellet und sehr schwach im Überstand detektiert (s. Abbildung 2.38). Kalkuliert wurde ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa (ca. 30 kDa hDDAH-2, ca. 4 kDa His-*tag* und Linker). Für die hDDAH-2 ohne Linker zwischen His-*tag* und Protein wurde ein Molekulargewicht von ca. 31 kDa kalkuliert (s. 2.4.1.1). Detektiert wurde das Protein bei ca. 33 kDa im Lysat und im Pellet. Die Proteinmenge im Überstand lag an der Detektionsgrenze. Dort wurde nur bei deutlich längerer Belichtungszeit des Fotofilms eine schwache Bande identifiziert (Daten nicht gezeigt). Für beide Fusionsproteine lag das ermittelte Molekulargewicht nach den Ergebnissen etwas höher als aus Berechnungen erwartet.

Bei der Untersuchung fiel auf, dass beide hDDAH-Fusionsproteine ein ähnliches Verhalten zeigten: Sie waren stark im Lysat und im Pellet der Zentrifugation nachweisbar aber kaum im Überstand. Auch die erneute Herstellung der Proteine im unabhängigen Experiment lieferte das gleiche Ergebnis. Damit wurde, anders als in der Publikation von 1999 gezeigt, kaum lösliche humane DDAH-2 mit dem von Leiper verwendeten Plasmid erzeugt.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Die Aktivität von hDDAH-2 und hDDAH-2JL wurde entsprechend der Publikation von Leiper *et al.* in Lysaten und Überständen der *E. coli*s untersucht (s. Abbildung 2.39). Als Substrate wurden neben L-NMMA und ADMA auch SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin getestet (s. 2.3.6.2.1) und die L-Citrullin-Bildung kolorimetrisch detektiert (s. 2.3.6.2.2). Da die Publikation von Leiper *et al.* keine Angaben zur eingesetzten Gesamtproteinmenge enthielt, wurde die Untersuchung mit einer Gesamtmenge von 50 μg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion durchgeführt. Als Positivkontrolle für die korrekte Durchführung des Assays wurde rekombinante hDDAH-1 inkubiert. Zusätzlich wurden Ansätze ohne Protein als Kontrolle der nicht-enzymatischen Substrathydrolyse und Ansätze ohne Substrat inkubiert, um endogenes L-Citrullin zu detektieren.

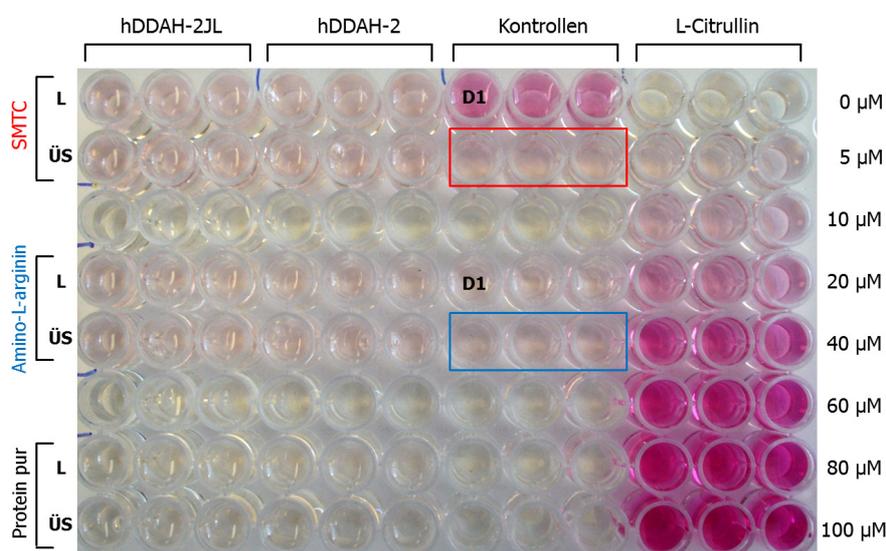


Abbildung 2.39: Repräsentativer DDAH-Aktivitätsassay in der Mikrotiterplatte mit kolorimetrischer Detektion des gebildeten L-Citrullins.

Repräsentatives Bild eines Aktivitätsassays in der Mikrotiterplatte. Ein Inkubationsansatz bestand aus 2 μg gereinigter, rekombinant hergestellter hDDAH-1 bzw. 50 μg (Gesamtprotein) Lysat oder Überstand DDAH-2-exprimierender *E. coli*s mit jeweils 1 mM SMTC, N^{ω} -Amino-L-arginin oder ohne Substrat in 100 mM Kaliumphosphatpuffer-Puffer (pH 6,8). Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die L-Citrullin-Bildung nach Derivatisierung bei 540,5 nm vermessen. L: Lysat. ÜS: Überstand der Zentrifugation bei $54.000 \times g$. D1: hDDAH-1. Roter Kasten: SMTC ohne Protein inkubiert. Blauer Kasten: N^{ω} -Amino-L-arginin ohne Protein inkubiert.

In Abbildung 2.39 ist das Foto eines repräsentativen DDAH-Aktivitätsassays für die Substrate SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin dargestellt. Für die hDDAH-1 konnte im Assay eine Umsetzung der Substrate zu L-Citrullin durch eine Rosafärbung der Pro-

ben nachgewiesen und quantifiziert werden. Damit wurde die Funktionalität des Assays verifiziert.

Die beiden verschiedenen hDDAH-2-Fusionsproteine verhielten sich sowohl im Lysat als auch im Überstand hinsichtlich ihrer Aktivität im Assay gleich. Es wurde bei den Substrat-inkubierten Proben eine schwache Rosafärbung vergleichbarer Intensität nachgewiesen. Diese zeigte sich nicht in den substratfreien Kontrollproben, wodurch endogene L-Citrullin-Quellen in der Probenmatrix als Ursache der Färbung der Proben ausschieden.

Die Inkubation der Substrate ohne Proteinlösung führte unter den Bedingungen des Assays auch zu einer Rosafärbung. Sie beruhte auf der Autohydrolyse der Substrate zu L-Citrullin und betrug für SMTC 0,15 % und für *N*^ω-Amino-L-arginin 0,12 %. Die Proben der beiden hDDAH-2-Fusionsproteine wiesen die gleichen Absorptionswerte wie die Kontrollproben der Substrate auf. Aus diesem Grund konnte die L-Citrullin-Detektion in den DDAH-2-haltigen Proben eindeutig auf die Autohydrolyse der Substrate zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse beim Aktivitätsassay mit L-NMMA oder ADMA entsprachen den beispielhaft gezeigten (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Autohydrolyse der Substrate war mit 0,04 % für L-NMMA und 0,08 % bei ADMA etwas geringer als bei den anderen Substraten. Damit konnte für keines der Substrate eine Umsetzung durch eine der beiden rekombinant hergestellten hDDAH-2-Fusionsproteine im Lysat oder Überstand von *E. coli* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Arbeitskreises von Leiper zur Aktivität von hDDAH-2JL ließen sich nicht reproduzieren.

2.4.4.2 Untersuchung der Reinigung N-terminal His-getaggtter hDDAH-2

Ende 2012 erschien eine Publikation von Manasi Nandi in Kooperation mit James Leiper, die unter anderem Aktivitätsuntersuchungen an gereinigter, rekombinant hergestellter hDDAH-2JL enthielt (Nandi *et al.*, 2012). Für die Reinigung des Proteins wurde auf eine Veröffentlichung zur Reinigung der paDDAH (Leiper *et al.*, 2002) verwiesen. Daher wurden eigene Experimente zur Reinigung von hDDAH-2JL in Anlehnung an die Publikation durchgeführt.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Dafür wurde eine 1000 ml Kultur wie unter 2.4.4.1 beschrieben zur Proteinbildung kultiviert, die Zellen geerntet und lysiert. Das Lysat wurde zur Gewinnung des Überstands entsprechend der Publikation zur Proteinreinigung nur bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Proteinbindung mit 1 ml Ni^{2+} -NTA-Matrix für 2 h bei 4°C inkubiert (s. 2.3.2.1.1). Die Matrix wurde in eine Säule geladen und mit 10 Bettvolumina (BV) imidazolfreiem Puffer gewaschen. Daran schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 10 BV Puffer mit 10 mM Imidazol an, bevor die Proteine mit je 5 BV Puffer mit 100 und 200 mM Imidazol eluiert wurden. Die Fraktionen wurden nach der Reinigung aufkonzentriert (s. 2.3.2.3) und der Proteingehalt aller Proben ermittelt (s. 2.3.2.4.1). Die gewonnenen Proben wurden per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (s. Abbildung 2.40).

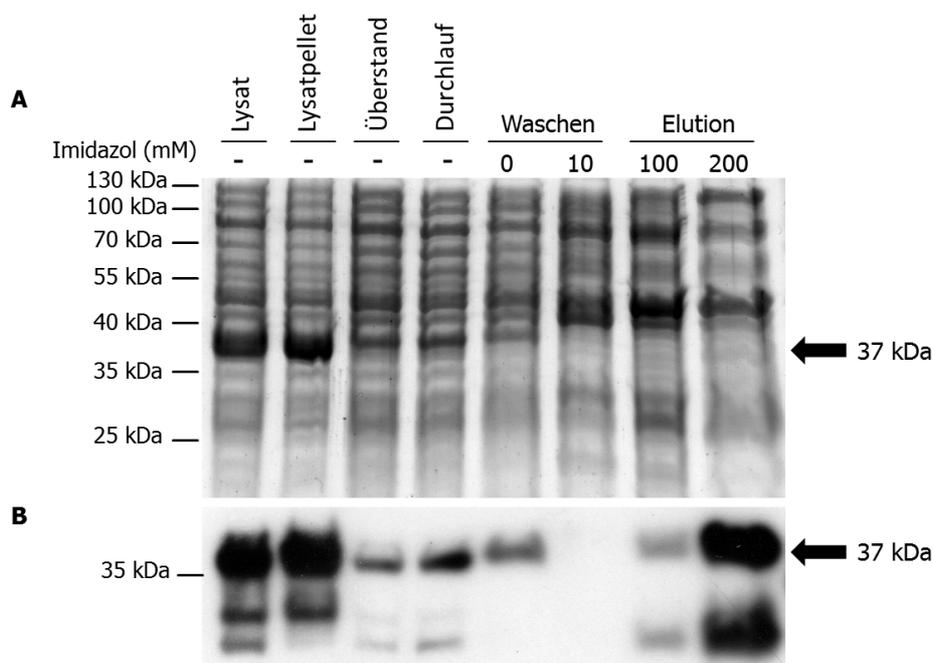


Abbildung 2.40: Analyse der hDDAH-2JL-Reinigung an Ni^{2+} -NTA.

SDS-Analyse (**A**) und Western Blot (**B**) von $9 \mu\text{g}$ Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion der hDDAH-2JL-Reinigung. Die Detektion der DDAH-2 erfolgte im Blot mit einem Antikörper gegen den DDAH-2 (1:30.000) bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa.

Bei der SDS-Analyse der Fraktionen konnte hDDAH-2JL klar im Lysat und im Lysatpellet nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.40 A). Im Überstand und im Durchlauf waren nur schwache Banden für das Protein nachweisbar. In den Fraktionen der Reinigung wurde keine Bande für das Fusionsprotein, dafür aber zahlreiche Banden von Wirtsproteinen identifiziert. Offensichtlich kam es zu einer unzureichenden Bin-

dung des Fusionsproteins an die Ni²⁺-NTA-Matrix. Eine Erhöhung der Inkubationszeit für die Proteinbindung (über Nacht) und des Puffervolumens zum Waschen der Matrix führte zu keiner verbesserten Reinigung der hDDAH-2JL (Daten nicht gezeigt). Somit konnte mit der angewendeten Reinigungsmethode kein reines hDDAH-2-Fusionsprotein gewonnen werden.

Wie erwartet wurde das Fusionsprotein im Western Blot im Lysat und im Pellet nachgewiesen (s. Abbildung 2.40 B). Überraschend war der starke Nachweis des Proteins im 200 mM imidazolhaltigen Eluat, der nicht mit einer Bande im Ergebnis der SDS-Analyse korreliert werden konnte.

In der löslichen Proteinfraction und den anderen Fraktionen der Reinigung war hDDAH-2JL nur schwach nachweisbar. Darüber hinaus ließen sich noch Banden bei niedrigerem Molekulargewicht detektieren, bei denen es sich möglicherweise um Fragmente oder Abbauprodukte der DDAH-2 handelte.

2.4.5 Rekombinante Herstellung GFP-getaggtter hDDAH-2 in *Dictyostelium discoideum*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Versuche zur gentechnologischen Herstellung der humanen DDAH-2 mit dem Eukaryoten *Dictyostelium discoideum* durchgeführt. Dazu wurden mir zwei Plasmide von Frau Dr. von Bülow zur Verfügung gestellt, in denen die hDDAH-2-DNA einmal N- und einmal C-terminal mit der DNA von GFP fusioniert wurde. Die GFP-Kopplung ermöglichte eine einfache visuelle Analyse der Proteinbildung in den Zellen über Fluoreszenzanalysen.

2.4.5.1 Voruntersuchung von *D. discoideum*

Zuerst wurden Wildtyp-Amöben des Schleimpilzes in einer Flüssig-Schüttelkultur wachsen gelassen (s. 2.3.3.2.6), geerntet und lysiert (s. 2.3.3.2.8). Die Lysate wurden im Vergleich zu den rekombinant hergestellten hDDAH-Enzymen mittels Western Blot (s. 2.3.2.6) mit den Anti-DDAH-Antikörpern untersucht (s. Abbildung 2.41). Damit sollte analysiert werden, ob in den Zellen DDAH-artige Proteine von den Antikörpern detektiert werden können.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

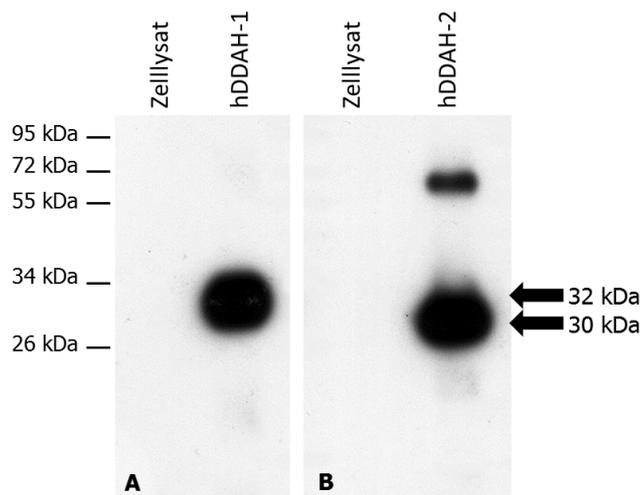


Abbildung 2.41: Western Blot-Analyse der *D. discoideum*-Zelllysate auf DDAH-Vorkommen.

Es wurden 0,1 µg gereinigte, rekombinant hergestellte hDDAH jeder Isoform oder 15 µg Gesamtprotein des Zelllysats pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-1-Antikörper (1:50.000; **Blot A**) bzw. Anti-DDAH-2-Antikörper (1:10.000; **Blot B**) entwickelt. Eine Bande für DDAH-1 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa, eine Bande für DDAH-2 bei ca. 31 kDa detektiert.

Beide DDAH-Antikörper konnten wie erwartet ihre jeweilige humane DDAH nachweisen (s. Abbildung 2.41). Dementgegen wurden in den Lysaten der Schleimpilze bei der gewählten Antikörperverdünnung keine Proteinbanden detektiert. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass der Organismus selbst keine Proteine produziert, deren Sequenz den humanen DDAH-Enzymen ähnelte. Die Zellen konnten daher problemlos für die Versuche zur hDDAH-2-Herstellung genutzt werden.

2.4.5.2 Herstellung von GFP-hDDAH-2-Fusionsproteinen

Als nächstes wurde die DNA der hDDAH-2 in zwei verschiedene Plasmide kloniert (s. 2.3.7), die eine konstitutive Proteinbildung ermöglichten. Das Plasmid pDXA-GFP2 diente der Herstellung und Untersuchung einer C-terminal GFP-getaggten hDDAH-2 (hDDAH-2dGFP). Mit dem Plasmid pTX-GFP war die Herstellung eines Fusionsproteins mit GFP-tag am N-Terminus möglich (dGFP-hDDAH-2). Um die Proteinausbeute zu steigern, wurde das Plasmid pDXA-GFP2 zusammen mit dem Plasmid pREP in Zellen verwendet.

Die Plasmide für die Fusionsproteine und die Leerplasmide wurden in Amöben transformiert (s. 2.3.1.10.2) und positive Klone identifiziert (s. 2.3.3.2.5). Von diesen Klo-

nen und Wildtyp-Amöben wurden Flüssigkulturen angelegt (s. 2.3.3.2.6) und die Bildung von GFP-Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. 2.3.4.1) untersucht (s. Abbildung 2.42). Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Bildung von DDAH-2-Fusionsproteinen und GFP-Proteinen untersucht.

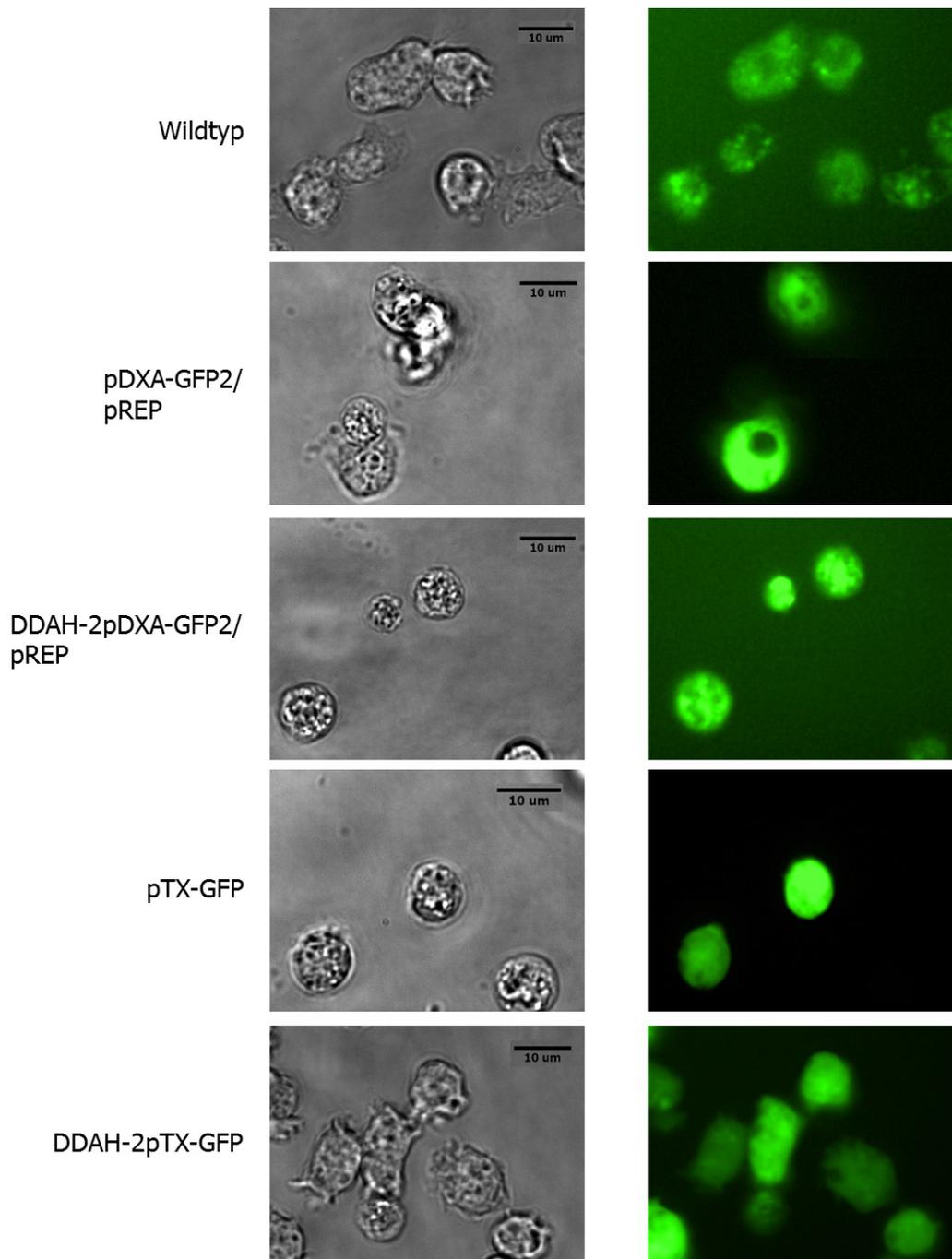


Abbildung 2.42: Mikroskopie von *Dictyostelium*-Zellen.

Aufgenommen wurden Wildtyp-Zellen und Zellen, die mit dem Leerplasmid bzw. dem Plasmid für hDDAH-2-GFP-Fusionsproteine transformiert wurden. **Links:** Hellfeldaufnahmen der Zellen **Rechts:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm, grün: GFP-Fluoreszenz. Bars = 10 μ m

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Amöben ergab keine auffälligen morphologischen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den transformierten Amöben (s. Abbildung 2.42 links). Bei der Fluoreszenzmikroskopie zeigten die Wildtyp-Amöben wie erwartet nur eine schwache Eigenfluoreszenz bei sehr starkem Hintergrund (s. Abbildung 2.42 rechts). *Dictyostelium*-Amöben, die mit dem jeweiligen Leerplasmiden transformiert wurden, fluoreszierten stark auf Grund des gebildeten GFPs. Amöben, die C-terminal GFP-getaggte hDDAH-2 (hDDAH-2dGFP) bilden sollten, wiesen ebenso wie die Wildtyp-Amöben nur eine geringe Fluoreszenz auf. Auch bei diesen Amöben war das Hintergrundsignal deutlich ausgeprägt, was auf eine fehlende Bildung von hDDAH-2dGFP in den Amöben hindeutete. Im Gegensatz dazu, konnte bei den Amöben mit potentieller dGFP-hDDAH-2-Bildung ein deutlicher Kontrast zwischen Fluoreszenz der Amöben zum Hintergrund detektiert werden. Daher wurde bei diesen Amöben eine Bildung des hDDAH-2-Fusionsproteins erwartet.

Die Zelllysate wurden zuerst mit einem Antikörper gegen DDAH-2 in der Verdünnung 1:10.000 untersucht. Dabei konnten überraschenderweise in den Lysaten der Amöben, die die Fusionsproteine bilden sollten, keine Banden für die DDAH-2-Proteine nachgewiesen werden. Auch eine Wiederholung des Experiments von der Transformation bis zur Entwicklung des Blots bei 10fach höherer Anti-DDAH-2-Konzentration, führte nicht zur Detektion von Banden für hDDAH-2-GFP-Fusionsproteine (Daten nicht gezeigt). Es war demzufolge bei keinem der Versuche gelungen hDDAH-2 in *Dictyostelium discoideum* herzustellen.

Um die GFP-Bildung zu untersuchen und zu klären, woher die Fluoreszenz bei den DDAH-2pTX-GFP-transformierten Zellen resultierte, wurden alle Lysate auch mit Anti-GFP-Antikörper untersucht (s. Abbildung 2.43).

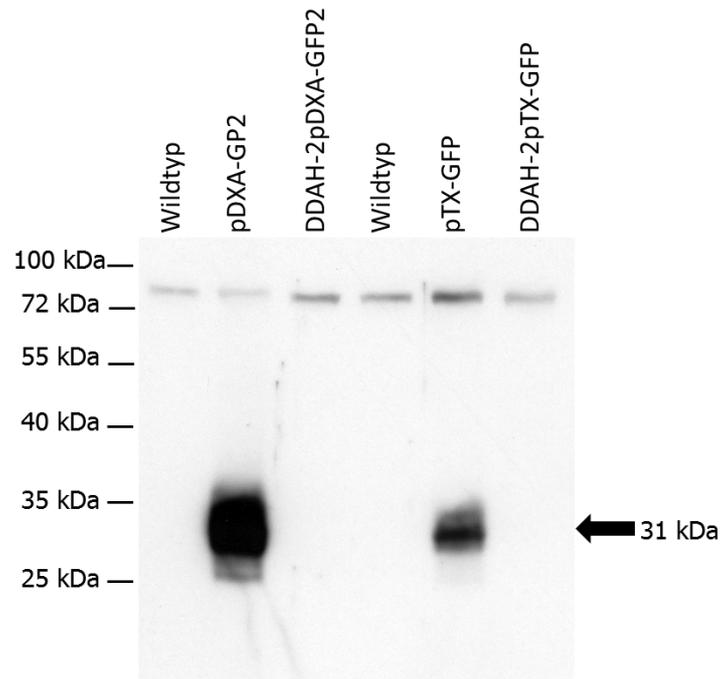


Abbildung 2.43: Western Blot der Bildung von GFP und GFP-hDDAH-2 in *D. discoideum*.

Es wurden 20 µg Gesamtprotein der Zelllysate pro Spur aufgetragen und mit einem Antikörper gegen GFP (1:10.000) entwickelt. Eine Bande für GFP wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert.

Die Analyse der Zelllysate mit einem Anti-GFP-Antikörper führte zur Detektion von GFP-Banden bei ca. 31 kDa in den Leerplasmid-transformierten Amöben (s. Abbildung 2.43). Darüber hinaus wurde in den Lysaten aller Amöben eine Bande bei ca. 90 kDa detektiert. Bei dieser Bande schien es sich um ein Wirtsprotein zu handeln, das nicht spezifisch auch in Wildtyp-Amöben nachgewiesen wurde. Erstaunlicherweise konnte trotz nachgewiesener Fluoreszenz (s. Abbildung 2.42 rechts) keine GFP-Bande in den DDAH-2 pTX-GFP-transformierten Amöben identifiziert werden. Auch bei Wiederholung des Experiments war dies nicht möglich.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.5 Diskussion

Die rekombinante Herstellung aller DDAH-Proteine wurde bisher nur in *E. coli* beschrieben (Kimoto *et al.*, 1998; Leiper *et al.*, 1999; Murray-Rust *et al.*, 2001).

E. coli wird häufig zur Produktion großer Mengen heterologer Proteine eingesetzt, die keine posttranslationalen Modifikationen für ihre Aktivität benötigen (Makrides, 1996; Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Das liegt daran, dass *E. coli* einfach und schnell (Generationszeit = 20 min) auf kostengünstigen Kohlenstoffquellen (Glucose) kultiviert werden kann. Außerdem ist die Genetik von *E. coli* im Vergleich zu anderen Mikroorganismen am besten charakterisiert (Baneyx & Mujacic, 2004). Die Vielzahl von existierenden Klonierungsvektoren und genetisch veränderten Wirtsstämmen sowie die leichte Transformierbarkeit ermöglichen zudem vielfältige Manipulationsmöglichkeiten (Makrides, 1996; Baneyx, 1999). Es ist jedoch nicht immer möglich, rekombinante Proteine in voller Länge als biologisch aktive Proteine in *E. coli* zu exprimieren (Baneyx, 1999; Ferrer-Miralles *et al.*, 2009).

Zur rekombinanten Herstellung von humaner DDAH-2 gab es bisher eine Veröffentlichung von (Leiper *et al.*, 1999). Darin wurde die Herstellung als His-getaggttes Fusionsprotein in *E. coli* beschrieben. Trotz His-tag wurde das hDDAH-2-Fusionsprotein nicht gereinigt. Eigene Versuche zur Herstellung His-getaggtter hDDAH-2 in verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Wirtssystemen scheiterten bislang (Kotthaus, 2008; Altmann, 2009).

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Isoformen-Selektivität der DDAH-Inhibitoren, wofür vergleichende Untersuchungen an beiden DDAH-Enzymen nötig waren. Da die Reinigung der nativen Enzyme (Ogawa *et al.*, 1989) als sehr aufwändig beschrieben wurde und hDDAH-1 bereits im Arbeitskreis rekombinant verfügbar war, sollte auch hDDAH-2 rekombinant hergestellt werden. Dafür wurden verschiedene Ansätze zur Herstellung in *E. coli* und *Dictyostelium discoideum* genutzt. Zusätzlich wurde eine Reinigung etabliert und Untersuchungen zur Proteinfaltung durchgeführt.

2.5.1 Herstellung und Untersuchung His-getaggtter hDDAH-2 in *E. coli*

Am Anfang der Arbeit erfolgte die gentechnologische Herstellung der humanen DDAH-2 analog zur DDAH-1 als N-terminal His-getaggttes Protein in *E. coli*. Bei einem Screening der Expressionsbedingungen war es erstmals möglich, hDDAH-2 in der löslichen Proteinfraction von *E. coli* nachzuweisen (s. 2.4.1.1 Abbildung 2.4). Dabei lieferte das von Hong und Fast, 2007 zur rekombinanten Herstellung von hDDAH-1 entwickelte Verfahren ("Fast"-Methode) den höchsten Anteil löslicher DDAH-2.

Zur Herstellung wurden *E. coli* BL-21(DE3) mit zusätzlichem pRep4-Plasmid verwendet. Durch dieses Plasmid stellen die Zellen konstitutiv den lacI^q -Repressor her und unterdrücken die basale Bildung heterologer Proteine weitgehend. Die Zellen entsprachen den Herstellerangaben für das verwendete Plasmid und lieferten im Vergleich zu BL-21-CodonPlus-RIL-Zellen das beste Herstellungsergebnis (s. 2.4.1.1 Abbildung 2.5). Die Codon-Plus-Zellen lieferten zusätzliche Kopien von Codons für die Aminosäuren Arginin (Codons AGA and AGG), Isoleucin (AUA) und Leucin (CUA) für die Proteinbildung. Die Bereitstellung dieser Codons war für die hDDAH-2-Synthese offensichtlich nicht der limitierende Faktor, denn die Verwendung der Zellen steigerte nicht die Bildung der DDAH-2.

Auch nach dem *scale-up* des Herstellungsverfahrens wurde lösliche hDDAH-2 nachgewiesen (s. 2.4.1.2 Abbildung 2.6). Hier fiel jedoch erstmals auf, dass das meiste Fusionsprotein bei der Fraktionierung von *E. coli*-Lysaten in den Pellets enthalten war. Der Nachweis von hDDAH-2 im Pellet nach einer $5.000 \times g$ -Zentrifugation deutete auf die Bildung von *inclusion bodies* hin (Singh & Panda, 2005). *Inclusion bodies* sind unlösliche Proteinaggregate, die häufig bei der Überexpression komplexer, rekombinanter Proteine entstehen (Baneyx & Mujacic, 2004). Durch den schnellen Anstieg der Proteinkonzentration im Cytosol ist die Proteinfaltung oft fehlerhaft (Baneyx, 1999). Dadurch wird die Interaktionswahrscheinlichkeit der hydrophoben Proteinbereiche erhöht und es kommt zum Ausfallen der unvollständig gefalteten Proteine im Cytosol (Middelberg, 2002). Die Bildung von *inclusion bodies* war zuvor auch bei der rekombinanten Herstellung der hDDAH-1 in *E. coli* beobachtet worden (Kimoto *et al.*, 1998). Hong und Fast führten die DDAH-1-Herstellung daher bei

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

15 °C durch, um die Bildung von *inclusion bodies* zu verringern und mehr lösliche hDDAH-1 zu gewinnen.

Wegen der niedrigen Umdrehungszahl bei der ersten Zentrifugation können nicht alle *inclusion bodies* abgetrennt, sondern auch mit in die Fraktion des Membranpellets verschleppt worden sein. Das würde den Nachweis von DDAH in dieser Fraktion erklären. Andererseits wäre auch eine Membranassoziation der hDDAH-2 bei Herstellung in *E. coli* denkbar. Hinweise dafür fanden sich auch in der Literatur (Birdsey *et al.*, 2000).

Bei der Analyse der Proteinfractionen wurde mit dem Anti-DDAH-2-Antikörper noch eine Bande bei ca. 60 kDa nachgewiesen (s. 2.4.1.2 Abbildung 2.6). Möglicherweise handelte es sich dabei um ein hDDAH-2-Dimer. Laut Literatur existiert *Pseudomonas aeruginosa* DDAH (paDDAH) als Dimer (Murray-Rust *et al.*, 2001), Säugetier-DDAH-1 aber als Monomer (Wang *et al.*, 2009). In welcher Form native DDAH-2 vorliegt ist bisher unklar. Für die Klärung dieser Frage z.B. per Native-PAGE oder analytischer Ultrazentrifugation wird reine hDDAH-2 benötigt, die nicht vorlag.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte hDDAH-2 nur als unlösliches Protein in *E. coli* gebildet und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden (Altmann, 2009). Diese denaturierte hDDAH-2 diente in dieser Arbeit als Kontrollprotein für die korrekte Durchführung von Western Blots und später zur Spezifitätstestung von Antikörpern (s. 3.4.1.1). Mit der erfolgreichen Herstellung löslicher hDDAH-2 bestand erstmals in dieser Arbeit die Möglichkeit, die Aktivität des nativen Enzyms zu testen. Dafür musste jedoch erst eine Methode zur nativen Reinigung des Proteins etabliert werden.

Auf Grund des His-*tags* am Fusionsprotein wurde eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA in Anlehnung an die Vorschrift zur Reinigung der hDDAH-1 gewählt (Kotthaus, 2008). Dabei kam es zu einer starken Anreicherung von hDDAH-2 in den Eluaten (s. 2.4.1.2 Abbildung 2.7), aber auch zur literaturbekannten Coelution von *E. coli*-Wirtsproteinen (Lichty *et al.*, 2005; Waugh, 2005). Diese Wirtsproteine haben eine hohe Affinität zu divalenten Kationen und treten besonders bei Verwendung von BL-21-Stämmen auf (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Laut Literatur ist die Bindung der Wirtsproteine an die Matrix dabei umso stärker, je weniger Zielprotein rekombi-

nant hergestellt wird. Daher liegt die Ursache der unzureichenden Matrix-Bindung und des suboptimalen Reinigungsergebnisses in der geringen Bildung der hDDAH-2. Bei der Reinigung der hDDAH-1 (s. 2.4.1.3 Abbildung 2.8) fiel einerseits ein höheres Molekulargewicht für das Fusionsprotein auf und andererseits die Verunreinigung der Eluate mit Wirtsprotein ähnlich der hDDAH-2-Reinigung. Die beobachtete Abweichung des aus der SDS-Analyse ermittelten zum theoretisch kalkulierten Molekulargewicht (ca. 5 kDa) war bereits literaturbekannt (Bogumil *et al.*, 1998; Kimoto *et al.*, 1998). Als Ursache der unerwarteten Migration im SDS-Gel wurden konformelle Eigenschaften der 3D-Struktur des Proteins diskutiert.

Auch die Coelution von Fremdproteinen war bei der Reinigung von hDDAH-1 und paDDAH nach Herstellung in *E. coli* beschrieben worden (Murray-Rust *et al.*, 2001; Hong & Fast, 2007). Eine weitere Aufreinigung erfolgte nur bei Herstellung dieser Proteine für Kristallisationsstudien, nicht aber für Aktivitätsanalysen (Stone *et al.*, 2005). Daher wurden für beide hDDAH-Enzyme nach nativer Reinigung Aktivitätsuntersuchungen mit dem Substrat ADMA durchgeführt. Das Substrat und die Metabolite wurden mit *ortho*-Phthaldialdehyd derivatisiert und nach Trennung per HPLC die Fluoreszenz der Derivate detektiert (s. 2.4.1.3). Die gewählte Analytik ermöglichte eine gute Trennung der Analyten (s. 2.4.1.3 Abbildung 2.9) und eine Quantifizierung des gebildeten L-Citrullins. Wie erwartet wurde für hDDAH-1 eine Umsetzung von ADMA detektiert, nicht aber für hDDAH-2. Selbst bei Einsatz großer hDDAH-2-Mengen wurde im Chromatogramm immer nur ein Peak für ADMA detektiert (s. 2.4.1.3 Abbildung 2.11 B). Dies bewies, dass hDDAH-2 im Gegensatz zur DDAH-1 kein ADMA umsetzte, obwohl beide Enzyme eine 50 %ige Sequenzidentität (Frey *et al.*, 2006) aufweisen und als gleichartige Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt und gereinigt wurden.

Um für weitere Aktivitätsstudien reinere hDDAH-2 einsetzen zu können, wurden verschiedene Ansätze zur Verbesserung der hDDAH-2-Reinigung ausprobiert.

Zuerst wurde die hDDAH-2Elong mit einer Linkersequenz aus 18 Aminosäuren und einer Faktor Xa-Schnittstelle zwischen *His-tag* und hDDAH-2-Sequenz hergestellt (s. 2.4.1.4). Die Struktur dieser DDAH-2 war der von Leiper und Kollegen beschriebenen rekombinant hergestellten hDDAH-2 sehr ähnlich (Leiper *et al.*, 1999).

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Eine Bildung der hDDAH-2Elong konnte von Dr. Kotthaus im Lysat und Lysatpellet von *E. coli* mittels Western Blot nachgewiesen werden (Kotthaus, 2008). Ihm gelang jedoch keine Bildung löslichen Proteins. Nachdem ein Vorversuch mit den von Kotthaus ermittelten Kulturbedingungen zur Bildung löslichen Proteins führte, wurde eine FPLC-Reinigung durchgeführt. Dabei wurde das Protein automatisiert mit einem linearen Imidazolgradienten an Ni²⁺-NTA aus der löslichen Proteinfraction gereinigt. Der große Vorteil der FPLC-Reinigung lag im optimalen *on-line*-Monitoring (s. 2.4.1.4 Abbildung 2.12) und der besseren Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Bereits beim Monitoring der Reinigung deutete sich eine mangelhafte Reinigung des Fusionsproteins an, die so auch in der SDS-Analyse bestätigt wurde (s. 2.4.1.4 Abbildung 2.13). Das Protein wurde wohl auch hier nur in geringer Menge gebildet, wodurch es wie bei hDDAH-2 (s. 2.4.1.2 Abbildung 2.7) zur starken Coelution von Wirtsproteinen kam. Die Modifikation des Abstandes zwischen His-*tag* und Protein führte daher nicht wie erhofft zu einer besseren Zugänglichkeit des *tags* für die Matrix und zu einer besseren Reinigung.

Da die Lokalisation des His-*tags* am N- oder C-Terminus von Proteinen die Bindungsstärke einiger Proteine an der Matrix beeinflusst (Kuo & Chase, 2011), sollte der His-*tag* am C-Terminus der hDDAH-2 positioniert werden. Leider stand kein Plasmid zur Verfügung, das die Bildung einer solchen hDDAH-2 ermöglichte. Daher wurde eine beidseitig His-getaggte hDDAH-2 hergestellt. Mit dem doppelten *tag* sollte eine bessere Bindung an die Matrix möglich sein (Kuo & Chase, 2011) und der N-terminale His-*tag* wäre über eine Proteaseschnittstelle abspaltbar gewesen. Ein Nachweis des doppelt getaggten Fusionsproteins war in der löslichen Proteinfraction möglich, wobei eine geringe Bildung des Proteins bereits ohne IPTG-Zusatz beobachtet wurde (s. 2.4.1.5.1 Abbildung 2.14). Das lag an den für die Verwendung der Plasmide pETM-14 und pETM-33 (für GST-hDDAH-2) vorgegebenen BL-21(DE3)-Zellen. In diesen Zellen ist eine Bildung von Fusionsproteinen ohne Induktorzusatz in Folge einer basalen Bildung von T7-Polymerase möglich. Eine Unterdrückung der Basalexpression durch Verwendung von *E. coli* BL-21(DE3)pREP4 war nicht möglich, da bei Transformation der Plasmide in die Zellen keine Klone erhalten wurden.

Die Fraktionierung zeigte auch für 2fach His-*tag* hDDAH-2 einen starken Anfall im Lysatpellet, was auf die erneute Bildung von *inclusion bodies* schließen ließ. Das Pro-

tein der löslichen Fraktion konnte, wie bei den anderen Fusionsproteinen, nicht rein gewonnen werden (s. 2.4.1.5.1 Abbildung 2.15). Die Ermittlung eines höheren apparenten Molekulargewichts für das 2fach His-*tag* Fusionsprotein lag an der Verwendung eines vorgefärbten Proteinmarkers für die Gel- und immunologischen Analysen. Die kovalente Kopplung von Farbstoffen an die Markerproteine verändert deren Laufverhalten etwas, so dass nur eine ungefähre Größenabschätzung möglich war.

Ein letzter Versuch die Reinigung der hDDAH-2 zu verbessern, lag in der Herstellung des Proteins mit abspaltbarem His-GST-Doppel-*tag* am N-Terminus und His-*tag* am C-Terminus. Der große GST-*tag* sollte einerseits einen effizienten Translationsstart ermöglichen und damit die Proteinausbeute steigern (Waugh, 2005). Andererseits sollte er das Protein stabilisieren, indem er das Fusionsprotein vor intrazellulärem, proteolytischen Abbau schützt (Terpe, 2003). Die Analyse der GST-hDDAH-2-Bildung in den Lysaten führte zur Detektion unvollständig gebildeten Fusionsproteins bei ca. 55 kDa (s. 2.4.1.5.2 Abbildung 2.17). Normalerweise sollte das Protein ein Molekulargewicht von 58 kDa haben. Während hDDAH-1 und 2fach His-*tag* hDDAH-2 in der Analytik sogar etwas höhere apparente Molekulargewichte zeigten (s. 2.4.1.3 Abbildung 2.8 und 2.4.1.5.1 Abbildung 2.14), belegte die verminderte Größe der GST-hDDAH-2 die fehlerhafte Bildung des Fusionsproteins. Möglicherweise kam es durch die massive GST-Fusionsproteinbildung zu einer bekannten metabolischen Stresssituation, die zum Abbruch der Proteinbildung führte (Waugh, 2005). Das Protein war jedoch in keinster Weise für weitere Arbeiten geeignet. Somit ermöglichte weder die Modifikation der Position des Affinitäts-*tags*, noch die Art des *tags* eine bessere DDAAH-2-Reinigung. Es stand daher keine reinere N-terminal His-getaggte hDDAAH-2 für weitere Aktivitätsstudien zur Verfügung.

Um dennoch die Richtigkeit des von Leiper und Kollegen postulierten Metabolismus für hDDAAH-2 zu prüfen, wurde die hDDAAH-2 nach Vorschrift der Publikation mit dem dort verwendeten Plasmid pProEx-Hta in *E. coli* hergestellt (Leiper *et al.*, 1999). Dabei waren die Angaben der Publikation zur Herstellung und Aufarbeitung des Proteins, sowie zur Analytik ungenau. Es wurden z.B. weder die exakte Art der verwendeten *E. coli*-Zellen angegeben, noch wurde bei der Analytik zwischen den Begriffen

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

"Lysat" und "lösliche Fraktion des Lysats" (entspricht dem Überstand der $54.000 \times g$ Zentrifugation) unterschieden. Bei der Proteinherstellung wurde daher so nah wie möglich an der eben genannten Publikation gearbeitet und alle anderen Schritte sinnvoll ergänzt.

Das Fusionsprotein, das mit dem Plasmid pProEx-Hta hergestellt wurde (hDDAH-2JL), enthielt zwischen His-*tag* am N-Terminus und der hDDAH-2-Sequenz einen Linker aus 20 Aminosäuren mit einer rTEV-Proteaseschnittstelle. Vergleichend dazu wurde die hDDAH-2 aus unserem Arbeitskreis, die keinen Abstand zwischen *tag* und Protein hatte, unter gleichen Bedingungen hergestellt.

Beide Proteine wurden hauptsächlich im Lysat und Lysatpellet nachgewiesen (s. 2.4.4.1 Abbildung 2.38). Lösliches Protein wurde dagegen im Überstand kaum detektiert. Das war verwunderlich, da von Leipers Gruppe die Bildung und Testung eines löslichen Proteins beschrieben wurde. Bei genauerer Betrachtung der Publikation fiel auf, dass sowohl im Methodenteil als auch bei der bildlichen Darstellung der Ergebnisse von Gesamtzellprotein bzw. von *E. coli* die Rede war. Im Ergebnisteil wurde allerdings vom Nachweis des Proteins in der löslichen Fraktion des Zelllysats gesprochen. Woher die Autoren die Löslichkeit der gebildeten DDAH-2 sicher ableiten blieb daher unklar. Der eigene Versuch zeigte für beide Proteine eine deutliche Bildung von *inclusion bodies*.

Darüber hinaus detektierte Leiper sein Protein bei ca. 39 kDa, während es mit der eigenen Analytik bei ca. 37 kDa nachgewiesen wurde. Interessanterweise gab die Publikation ein Molekulargewicht von 35 kDa für hDDAH-2 an, während das Protein laut Datenbank ca. 29,644 kDa groß ist (Datenbank: UniProtKB, Eintrag: O95865). Der Ursprung der Publikationsdaten konnte nicht nachvollzogen werden, so dass die Unterschiede bei den Größenangaben der hDDAH-2 nicht geklärt werden konnten.

Im Anschluss an die Herstellung der Proteine wurde mit den frischen Fraktionen eine Aktivitätsuntersuchung entsprechend der Publikation durchgeführt. Da aus der Publikation nicht klar ersichtlich war, ob mit Lysat oder Überstand der Zentrifugation gearbeitet wurde, wurden beide Fraktionen getestet. Dabei wurde für den Überstand keine Aktivität erwartet, nachdem dort praktisch kaum DDAH-2 nachgewiesen wurde. Als physiologische Substrate für die DDAH-Enzyme wurden L-NMMA und ADMA ge-

testet (Leiper *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden auch Umsetzungen von SMTC und N^{ω} -Amino-L-Arginin als alternative Substrate für *Pseudomonas aeruginosa* DDAH (paDDAH, Stone *et al.*, 2005) und hDDAH-1 (Wang *et al.*, 2009) beschrieben. Daher wurden diese Verbindungen im Assay auch getestet. Das Ergebnis war überraschend: Es konnte mit keinem der Substrate im Lysat oder im Überstand eine Umsetzung durch eines der beiden hDDAH-2-Fusionsproteine zu L-Citrullin detektiert werden (s. 2.4.4.1 Abbildung 2.39). Jegliche L-Citrullin-Bildung, die in den DDAH-2-haltigen Proben erfasst wurde, resultierte aus der Autohydrolyse der Substrate unter Assaybedingungen. Dabei lag der Wert von L-NMMA mit 0,04 % unter der literaturbekannten Hydrolyserate von 0,3 %, während das Ergebnis für ADMA (0,08 %) dem Literaturwert entsprach (Knipp & Vasák, 2000). Für SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin, deren Hydrolyseraten leicht erhöht waren, fehlten Vergleichswerte. Auch bei Wiederholung der Arbeiten verhielten sich beide DDAH-2-Fusionsproteine gleich.

Damit widersprachen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten denen aus der Publikation von Leiper *et al.*, 1999 zur Aktivität der humanen DDAH-2. Es war nicht möglich die Umsetzung von L-NMMA und ADMA durch hDDAH-2JL zu reproduzieren, obwohl die Umsetzung aller Substrate durch hDDAH-1 die korrekte Durchführung der Assays belegte (s. 2.4.4.1 Abbildung 2.39).

Es kann an Hand der wenigen experimentellen Daten der Publikation nicht ausgeschlossen werden, dass methodische Unterschiede zu den verschiedenen Ergebnissen zwischen der Publikation und den eigenen Arbeiten führten. Kritikpunkte an der Publikation sind jedoch die Diskrepanz des angegebenen Molekulargewichts der humanen DDAH-2 zum Literaturwert, die genannten Unklarheiten zwischen Methoden- und Ergebnisteil und die Studie der hDDAH-2JL-Aktivität im Lysat trotz Reinigungsmöglichkeit über den His-tag. Eine Aktivitätsmessung im Lysat führt auf Grund der hohen Eigenabsorption der Proteine zu ungenauen Ergebnissen und Störungen der Enzymaktivität durch Matrixbestandteile können auch nicht ausgeschlossen werden. Die Autoren unterließen es in der Publikation jedoch die rekombinant hergestellte hDDAH-2 zu reinigen und den kausalen Zusammenhang zwischen der gemessenen Aktivität und dem Enzym zweifelsfrei zu belegen.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Darüber hinaus war es auch anderen Gruppen trotz intensiver Bemühungen nicht möglich, aktive hDDAH-2 rekombinant herzustellen. Knipp untersuchte die Aktivität von hDDAH-2 mit und ohne verschiedenen *tags* (jeweils am N- und C-Terminus) nach Herstellung in *E. coli* und konnte die Daten von Leiper unter gleichen Versuchsbedingungen nicht bestätigen (Knipp, 2007). Fast und Kollegen gelang ebenfalls weder in *E. coli* noch in Insektenzellkulturen eine Herstellung des aktiven Proteins (Walter Fast, Texas, persönliche Kommunikation).

Eine Publikation aus dem letzten Jahr enthielt neue Informationen zur Aktivität reiner, rekombinant hergestellter hDDAH-2JL, gab aber weder Methodik noch Rohdaten zur genauen Reinigung und Aktivitätsanalytik an (Nandi *et al.*, 2012). Verweise auf andere Publikationen ermöglichten keine genaue Reproduktion der Arbeiten für das humane DDAH-2-Fusionsprotein. Eigene Reinigungsversuche in Anlehnung an die entsprechenden Publikationen ermöglichten keine Isolation des Fusionsproteins (s. Abbildung 2.40). Wie bei der hDDAH-2-Reinigung (s. 2.4.1.2 Abbildung 2.7) kam es wohl auch hier zu einer unzureichenden Bindung von hDDAH-2JL an die Ni²⁺-NTA-Matrix und zur Coelution zahlreicher Wirtsproteine.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich hDDAH-2JL und hDDAH-2 in den eigenen Studien gleich verhielten. Bei beiden Fusionsproteinen wurde kaum lösliches Protein im Überstand nachgewiesen und beide setzten keins der getesteten Substrate um. Das deutete sowohl bei hDDAH-2 als auch bei hDDAH-2JL auf eine fehlende Enzymaktivität hin.

2.5.2 Untersuchungen zur Faltung von hDDAH-2 in *E. coli*

Neben den Bestrebungen, die humane DDAH-2 mit verschiedenen *tags* zu stabilisieren und so die Reinigung zu verbessern, wurde auch eine gesteigerte Bildung löslicher DDAH-2 fokussiert. Dabei wurde ein Ansatz verfolgt, der den Gehalt der molekularen Chaperone in *E. coli* steigert, da diese eine wichtige Rolle bei der Faltung neugebildeter Proteine und der Solubilisierung bereits aggregierter Proteine spielen (Marco *et al.*, 2007). Die Chaperone unterstützen andere Proteine ihre native 3D-Struktur richtig auszubilden und somit bestimmte Eigenschaften wie z.B. Löslichkeit und Enzymaktivität zu zeigen (Wall & Plückthun, 1995). Allerdings gibt es keine Ga-

rantie, dass Chaperone die Löslichkeit rekombinant hergestellter Proteine verbessern (Sørensen & Mortensen, 2005b).

Kyratsous *et al.* etablierten in einem neuartigen Ansatz die Fusion der DNA des Zielproteins mit der DNA eines der *E. coli*-eigenen Chaperone DnaK bzw. GroEL (Kyratsous *et al.*, 2009). Damit erreichten sie für mehrere, bei Herstellung in *E. coli* normalerweise unlösliche Proteine, eine Erhöhung des löslichen Proteinanteils. Eine Herstellung der Fusionsproteine mit dem zum jeweiligen Chaperon gehörenden Cochaperon steigerte die lösliche Proteinausbeute noch weiter. Darüber hinaus bewies die Gruppe, dass die Herstellung der Chaperonfusionsproteine den löslichen Anteil der getesteten Proteine stärker steigert, als die parallele aber separate Herstellung von Zielprotein und Chaperon.

Für die Versuche wurde die kodierende DNA der hDDAH-2 in Plasmide kloniert, die jeweils ein Gen für DnaK bzw. GroEL enthielten. Beide resultierenden Fusionsproteine konnten nachfolgend erfolgreich in der löslichen Fraktion von *E. coli* nachgewiesen werden (s. 2.4.2.1 Abbildung 2.19 und Abbildung 2.20). Der lösliche Anteil von DnaK-hDDAH-2 stieg wie erwartet mit steigender Temperatur und Induktorkonzentration. Für GroEL-hDDAH-2 konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden. Hier wurden im Blot auch Banden für potentiell unvollständig gebildetes Fusionsprotein detektiert (Abbildung 2.20). Dieser Verdacht wurde bestätigt, als in der SDS-Analyse der Zeitabhängigkeit der Fusionsproteinbildung die Molekulargewichtsdifferenzen zwischen den Chaperonen und den Fusionsproteinen betrachtet wurden (s. 2.4.2.1 Abbildung 2.22). Die Differenz im Laufverhalten zwischen DnaK und DnaK-hDDAH-2 war sehr gering, die von GroEL-hDDAH-2 zu GroEL größer. Dennoch lagen beide Fusionsproteine hauptsächlich in unvollständiger Form vor. Dies könnte auf die Induktion einer metabolischen Stresssituation durch Überexpression der heterologen Proteine in *E. coli* zurückzuführen sein. Das kann einerseits zur Bildung von Abbruchproteinen führen (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009) und andererseits den intrazellulären proteolytischen Abbau der heterologen Proteine initiieren und fördern (Enfors, 1992; Sørensen & Mortensen, 2005a).

Die Ergebnisse der SDS-Analyse legten einen stressinduzierten Abbruch der Translation für beide Chaperonfusionsproteine nahe. Eine Erklärung für den unmittelbaren

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Abbruch der DnaK-hDDAH-2-Bildung könnte in einer erhöhten strukturellen Plasmidinstabilität liegen (Wall & Plückthun, 1995). Gerade die Überproduktion von DnaK ohne Cochaperone induziert eine Instabilität, die durch Punktmutationen und Deletionen zu Abbrüchen in der Sequenz führen kann. Darüber hinaus wurde im Western Blot eine Reduktion des löslichen Anteils der Fusionsproteine bei steigender Expressionsdauer detektiert (s. 2.4.2.1 Abbildung 2.22 B). Dies deutete auf einen zusätzlichen proteolytischen Abbau *in vivo* hin. Aus diesem Grund wurde die Expressionsdauer begrenzt und die Zellen im späteren Verlauf der Arbeit für die Proteinisolierung möglichst zügig aufgearbeitet. Da mit dem Blot auch eine bessere Bildung von GroEL-hDDAH-2 im Vergleich zu DnaK-hDDAH-2 nachgewiesen wurde, erfolgten weitere Arbeiten mit dem GroEL-Fusionsprotein.

Die Herstellung der hDDAH-2-Chaperonfusionsproteine in Anwesenheit ihres jeweiligen Cochaperons steigerte den löslichen Proteinanteil nicht (s. 2.4.2.1 Abbildung 2.21). Kyratsous und Kollegen führten die gesteigerte Löslichkeit ihrer Proteine unter diesen Bedingungen auf die verbesserte Faltung zurück. Im Falle der humanen DDAH-2 stellte die Faltung nach diesen Ergebnissen nicht den limitierenden Faktor für die Herstellung löslichen Proteins in *E. coli* dar. Die teilweise Verminderung der Proteinbildung bei Herstellung mit Cochaperon im Vergleich zur Herstellung ohne, lag am Chloramphenicol. Dieses musste bei der Zellkultur zugesetzt werden, um das Plasmid mit dem Cochaperon in den Zellen zu behalten. Chloramphenicol hemmte allerdings die Translation (Harvey & Koch, 1980) und verminderte die DDAH-2-Bildung bei gleicher Herstellungsdauer etwas.

Die affinitätschromatographische Reinigung von GroEL-hDDAH-2 lieferte über den C-terminalen His-*tag* das beste Reinigungsergebnis für DDAH-2-Fusionsproteine in dieser Arbeit. In der SDS-Analyse wurden nur geringfügige Verunreinigungen festgestellt, wobei das letzte Eluat fast reines Protein enthielt (s. 2.4.2.2 Abbildung 2.23 A). So konnte erstmals rekombinante hDDAH-2 mit vergleichbar gutem Reinheitsgrad, wie rekombinante hDDAH-1 gewonnen werden. Im Western Blot wurden auf Grund der niedrigeren Detektionsgrenze noch weitere Proteinbanden in den Eluaten detektiert, deren Molekulargewichte unter dem des Fusionsproteins lagen. Die Signalintensität dieser schwächeren Banden korrelierte nicht mit der Stärke der Banden im SDS-

Gel (s. 2.4.2.2 Abbildung 2.23 B). Daher handelte es sich bei den Blot-Banden wohl um Fragmente des Fusionsproteins. Es könnte sich teilweise auch um bereits zuvor vom Antikörper unspezifisch detektierte, *E. coli*-eigene Proteine handeln (s. 2.4.2.1).

Für das gereinigte Fusionsprotein wurde die Umsetzung von postulierten und alternativen Substraten im Vergleich zu hDDAH-1 untersucht. Alle Substrate wurden wieder von rekombinant hergestellter hDDAH-1 zu L-Citrullin umgesetzt (s. 2.4.4.1), aber nicht von GroEL-hDDAH-2 (s. 2.4.2.3 Abbildung 2.24). Durch die Größe des GroEL-Restes (60 kDa) konnte eine Beeinflussung der Struktur der hDDAH-2 (30 kDa) nicht ausgeschlossen werden. Daher ließ sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher auf das Fehlen einer endogenen, hydrolytischen Aktivität der DDAH-2 schließen. Für hDDAH-1 wurde ein Anstieg der Substratumsetzung von N^{ω} -Amino-L-arginin zu SMTC beobachtet. Für paDDAH waren bereits K_m -Werte aller Substrate bekannt (Stone *et al.*, 2005), die, auf Grund der 30 %igen Sequenzidentität zwischen den Enzymen, ein solches Ergebnis auch für hDDAH-1 nahelegten (Frey *et al.*, 2006).

Parallel zu den Aktivitätsstudien wurden Versuche durchgeführt, um GroEL vom gereinigten Fusionsprotein abzuspalten. Dazu wurde das Fusionsprotein unterschiedlich lange (s. 2.4.2.4 Abbildung 2.25) mit verschiedenen Mengen Thrombin bei 4 °C und nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur (s. 2.4.2.4 Abbildung 2.26) inkubiert. Ein Abbau des Fusionsproteins war in allen behandelten Proben nachweisbar (s. Abbildung 2.25). Potentielle Banden für die gespaltenen Proteine zeigten keine Abhängigkeit ihrer Signalstärke von der Inkubationsdauer oder Thrombinmenge. Da in einem Puffer ohne Proteaseinhibitoren gearbeitet wurde, deuteten die Ergebnisse eher auf einen Abbau von GroEL-hDDAH-2 durch anderen Proteasen als Thrombin hin. Auf Grund von Verunreinigungen im Thrombin und dem Mangel an hochreinem Fusionsprotein, waren klare Aussagen zum Erfolg des Thrombinverdaus allerdings weder mit der SDS-Analytik noch per Western Blot möglich. Abhilfe hätte nur die Verwendung reineren Thrombins und eine bessere Reinigung des Fusionsproteins unter Zusatz von Proteaseinhibitoren, die nicht gegen Thrombin gerichtet sind, schaffen können. Nach den vorliegenden Ergebnissen bestand nicht die Möglichkeit, den GroEL-tag in weiteren Untersuchungen als Ursache der fehlenden Enzymaktivität des hDDAH-2-Fusionsproteins (s. 2.4.2.3) auszuschließen.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

Da die Struktur eines Enzyms entscheidend für seine Aktivität ist, sollte die Faltung der humanen DDAH-2 bei Synthese in *E. coli* untersucht werden. Da es für das Protein noch keine bekannte Kristallstruktur gibt, war eine Kontrolle der Faltung durch Strukturanalyse nicht möglich. Daher sollte die grundsätzliche Faltung der hDDAH-2 mit Hilfe einer GFP-Fusion bei rekombinanter Herstellung in *E. coli* untersucht werden. GFP ist ein biolumineszierendes Protein mit einem kovalent gebundenen Fluorophor, das 1962 erstmals aus *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura *et al.*, 1962). GFP weist als Besonderheit eine Autofluoreszenz auf, für die das Protein weder Substrate noch Cofaktoren benötigt, sondern sich lediglich richtig falten muss (Cody *et al.*, 1993). Waldo und Kollegen zeigten, dass die Bildung des GFP-Fluorophors bei C-terminal GFP-fusionierten Proteinen direkt mit deren Faltung und Löslichkeit korreliert (Waldo *et al.*, 1999). Fehlgefaltete GFP-Fusionsproteine weisen wegen der gestörten Fluorophor-Bildung keine Fluoreszenz auf. Aus diesem Grund wurde GFP unter anderem als „Faltungsreporter“ und Kontrolle bei der rekombinanten Proteinherstellung genutzt (Albano *et al.*, 1998; Newstead *et al.*, 2007; Müller-Lucks *et al.*, 2012). Mit der Fluoreszenzmessung und vergleichenden Aktivitätsstudien zwischen gereinigter hDDAH-2-GFP und hDDAH-1-GFP, sollte der Nachweis der korrekten Faltung als strukturelle Voraussetzung der Enzymaktivität erbracht werden.

Nach der Klonierung der jeweiligen hDDAH-DNA in das Plasmid pIVEX2.3wGFPc, erfolgten die Herstellung von hDDAH-2-GFP im Vergleich zu GFP in *E. coli*. Die stärkste Fluoreszenz wurde bei hDDAH-2-GFP-Lysaten bei 30 °C gemessen und war IPTG unabhängig (s. 2.4.3.1 Abbildung 2.28). Die Reduktion der GFP-Fluoreszenz bei 37 °C entsprach früheren Beobachtungen zur Thermosensitivität von GFP bei Temperaturen über 30 °C (Lim *et al.*, 1995; Siemering *et al.*, 1996). Außerdem fiel auf, dass GFP-Fluoreszenz bereits ohne IPTG-Zusatz detektiert werden konnte. Die Analyse des Plasmids ergab das Fehlen eines Lac-Operons, das einen IPTG-Zusatz zum Start der Proteinbildung überflüssig machte. Daher konnte auch keine Abhängigkeit der Proteinbildung und der Fluoreszenz von der IPTG-Konzentration erwartet werden.

Das Lysat nicht induzierter hDDAH-2-GFP-Zellen wies bei 37 °C keine Fluoreszenz auf. Dieses Ergebnis korrelierte mit dem fehlenden Nachweis des Fusionsproteins in der Western Blot-Analyse der Lysate (s. 2.4.3.1 Abbildung 2.29). Die ebenfalls beo-

bachtete Diskrepanz zwischen der Bildung von hDDAH-2-GFP und der zuvor gemessenen Fluoreszenz in den zugehörigen Lysaten, lieferte einen ersten Hinweis auf eine parallele Bildung von GFP in den Zellen. Dieser Verdacht wurde bei einer Reinigung von hDDAH-2-GFP unter denaturierenden Bedingungen bestätigt. Neben dem Fusionsprotein wurden große Mengen GFP in den Eluaten nachgewiesen (s. 2.4.3.2 Abbildung 2.30). Die Ursache lag in den beiden ATG-Startcodons, die am Anfang der GFP-Sequenz identifiziert wurden (s. 2.4.3.2 Abbildung 2.31). Diese Codons dienten neben dem ATG der hDDAH-2-DNA als Startpunkt der mRNA-Synthese und führten zur parallelen Expression des GFP-Gens. Durch die starke Bildung von GFP-mRNA entstand so eine Konkurrenzsituation um die Kapazität der zellulären Translationsmechanismen zu Lasten von hDDAH-2-GFP. Eine Elimination der Startcodons durch Veränderung der DDAH-GFP-Sequenz sollte das Problem lösen.

Zuvor wurde allerdings die Stabilität von GFP in der cytosolischen Fraktion ermittelt. Der Grund dafür lag in der fehlenden Fluoreszenz von GFP und hDDAH-2-GFP im SDS-Gel und in den Eluaten nach der Reinigung. Die SDS-Proben waren wie bei cytosolischen Proteinen üblich bei 95 °C für 10 min hergestellt worden. Danach wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Ob der Verlust des Fluorophors von der thermischen Denaturierung oder dem Einfrieren kam, war daher nicht ganz klar. Zusätzlich führte die Reduktion des pH-Werts bei der denaturierenden Reinigung zum Fluoreszenzverlust. Dabei war die pH-Stabilität insbesondere für die geplante Reinigung der GFP-Fusionsproteine entscheidend.

Natives, gereinigtes *Aequorea*-GFP (aGFP) wird als sehr stabil gegenüber Hitze, pH, Proteasen und denaturierend wirkenden Stoffen beschrieben (Bokman & Ward, 1981). Als Ursache wird seine kompakte und starre β -can-Struktur angeführt (Alkaabi *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde GFP in der cytosolischen Fraktion unter nativen und denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) untersucht (s. 2.4.3.3). Die im Versuch ermittelte Temperaturstabilität des nativen GFPs war vergleichbar mit den Untersuchungen von (Bokman & Ward, 1981). Sie wiesen für gereinigtes GFP unter nativen Bedingungen eine lineare Abnahme der Fluoreszenz bei Temperaturen über 60 °C nach. Über 90 °C war auf Grund einer Zerstörung der Sekundärstruktur keine Fluoreszenz messbar (Bokman & Ward, 1981). Die GFP-Struktur wurde bei

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

solch hohen Temperaturen also definitiv zerstört. In Anwesenheit von 8 M Harnstoff kam es bei pH 8 und Temperaturen über 50 °C zu einem drastischen bis vollkommenen Verlust der GFP-Fluoreszenz (s. 2.4.3.3 Abbildung 2.32). Dies widersprach den Ergebnissen von (Alkaabi *et al.*, 2005), die diesen Effekt erst bei einer Reduktion des pH-Wertes auf 6,5 sahen. Die Gruppe von Alkaabi arbeitete mit reinem GFP, dem der Harnstoff unmittelbar vor der Messung zugesetzt wurde. In dieser Arbeit wurden die GFP-bildenden Zellen für eine Stunde mit Harnstofflösung inkubiert, um das denaturiert aufgearbeitete Cytosol zu gewinnen. Außerdem wurde nicht mit reinem Protein gearbeitet. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf diese Unterschiede in der Durchführung der Arbeiten zurückführen.

Über die Einfrier-Auftau-Stabilität gab es in der Literatur keine Daten. Während mehrmaliges Einfrieren und Auftauen keinen Einfluss auf die Fluoreszenz von nativem GFP im Cytosol hatte, wurde die Fluoreszenz von GFP in Anwesenheit von 8 M Harnstoff bereits ab dem ersten Einfrieren nahezu eliminiert (s. 2.4.3.3 Abbildung 2.33). Das würde die Beobachtung von Bokman und Ward, 1981 stützen, dass die GFP-Fluoreszenz unter denaturierten Bedingungen instabiler ist.

Auch die Daten zur pH-Stabilität von nativem GFP passten in etwa zu denen von Bokman und Ward. Im Bereich von pH 7-8 war die Fluoreszenz kaum verändert, nahm dann aber ab bis beim pH unter 6 kaum noch etwas detektierbar war (s. 2.4.3.3 Abbildung 2.34). Bokman und Ward fanden unter pH 4 keine Fluoreszenz mehr, konnten aber nach Neutralisation und Inkubation der Proben bei 4 °C für 24 h bis zu 90 % der Fluoreszenz regenerieren. Eine Renaturierung war bei nativem GFP nach acider Denaturierung nur zu 42 % möglich. Da die Proben nach der Neutralisation bis zur Messung nur ca. 2 h auf Eis lagerten, konnte die Renaturierung noch nicht vollständig sein und erklärte die Differenz in der Wiederherstellung der Fluoreszenz. Bei denaturierend aufgearbeitetem GFP war in Anwesenheit von Harnstoff keine Fluoreszenz mehr unter pH 7 messbar und auch keine Renaturierung möglich. Damit stimmten die Ergebnisse mit denen von Alkaabi und Kollegen überein. Sie beobachteten für reines GFP bei pH 6,5 eine Abnahme der Fluoreszenz zu mehr als 75 % innerhalb von 30 min.

Zusammenfassend konnte für natives GFP im Cytosol eine deutlich höhere Stabilität als für GFP in Anwesenheit von 8 M Harnstoff nachgewiesen werden. Im nativen Zu-

stand wurden Veränderungen von Temperatur und pH-Wert besser vom GFP toleriert und das Protein war im Cytosol auch lagerstabil bei -20 °C. Es wurde erwartet, dass sich GFP-Fusionsproteine bei korrekter Faltung im Cytosol ähnlich verhalten würden wie GFP. Daher sollte eine Reinigung von hDDAH-GFP unter nativen Bedingungen bei pH 7 ohne großen Verlust an Fluoreszenz möglich sein. Die Ergebnisse erklärten außerdem den Verlust der GFP-Fluoreszenz der bei 95 °C behandelten SDS-Proben und der Eluate der denaturierenden Reinigung mit dem pH-Wert von 4,5.

Für die Herstellung der DDAH-GFPs wurden zuerst die ATGs aus dem GFP der Plasmide mutiert und die Proteinbildung in *E. coli* untersucht. Dabei wurde nur noch in pIVEX2.3wGFPcMut-transformierten Zellen die Bildung von mutiertem GFP detektiert. In Zellen, die hDDAH-2GFPMut bildeten, wurde kein isoliertes GFP nachgewiesen, so dass die Mutation erfolgreich die alleinige GFP-Bildung unterdrückte (s. 2.4.3.4 Abbildung 2.36). Die Bildung von hDDAH-2GFPMut wurde mittels Western Blot nachgewiesen (s. 2.4.3.4 Abbildung 2.37). Durch den Wegfall der parallelen GFP-Bildung sollte die Kapazität der Zelle zur Bildung des Fusionsproteins eigentlich gesteigert sein. Eine Verstärkung der hDDAH-2-GFPMut-Bildung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Auch der lösliche Anteil des Proteins wurde nicht gesteigert. Nach den vorherigen Erfahrungen war die Reinigung des hDDAH-2-Fusionsproteins bei so extrem niedrigen Bildungsraten aussichtslos.

Im Vergleich zur hDDAH-2 war es außerdem bei hDDAH-1 wiederholt nicht möglich, das GFP-getaggte Protein herzustellen. Die Sequenz von hDDAH-1 war nach der Klonierung in das Zielplasmid und nochmals nach der Mutation des GFP per Sequenzierung verifiziert worden. Die Ursache für die fehlende Proteinbildung trotz korrekter DNA-Sequenz konnte nicht ermittelt werden. Da hDDAH-2GFP sowohl vor als auch nach der Mutation herstellbar war, dürfte die GFP-Fusion die DDAH-1-Bildung allerdings nicht beeinflussen.

Es war im Rahmen dieser Arbeit an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht gelungen beide DDAH-Enzyme herzustellen, zu reinigen und vergleichend auf Fluoreszenz und Aktivität zu untersuchen. Dadurch konnte der Beweis der korrekten Faltung als Voraussetzung der Enzymaktivität der hDDAH-2-GFPMut bei Herstellung in *E. coli* nicht erbracht werden.

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

2.5.3 Herstellung humaner DDAH-2 in *D. discoideum*

Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist ein einfacher, schnell und kostengünstig zu kultivierender eukaryotischer Einzeller, dessen zelluläre Organisation typisch für höhere Eukaryoten ist (Williams *et al.*, 2006). Die einzelligen Amöben bilden bei Nahrungsknappheit per Chemotaxis und Zellwanderung einen multizellulären Organismus aus und durchlaufen dann einen vielschichtigen Entwicklungszyklus (Slade *et al.*, 1997). Dieser Schleimpilz bietet außerdem zahlreiche Möglichkeiten der genetischen Manipulation, die wegen seines haploiden Chromosomensatzes sofort phänotypisch detektiert werden können (Williams *et al.*, 2006). Aus diesen Gründen ist *D. discoideum* ein wichtiger Modellorganismus zur Untersuchung grundlegender Prozesse der Zell- und Entwicklungsbiologie wie Chemotaxis, Zellbeweglichkeit, Zelldifferenzierung und Apoptose. Durch die Entdeckung von 33 *Dictyostelium*-Genen, die Orthologe humaner krankheitsassoziierter Gene sind, fokussierte sich die humane biomedizinische Forschung auf *D. discoideum* (Eichinger *et al.*, 2005).

Daneben wurden die Amöben auch erfolgreich zur rekombinanten Herstellung von Glykoproteinen eingesetzt (Slade *et al.*, 1997). Der Pilz ist im Gegensatz zu *E. coli* in der Lage, eukaryotische Proteine bei der Herstellung nach Bedarf posttranslational zu modifizieren. Das kann die Herstellungsprobleme eukaryotischer Proteine in *E. coli* lösen (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Vorteile des Schleimpilzes im Vergleich zum eukaryotischen Expressionssystem *Saccharomyces cerevisiae* liegen in der fehlenden Hyperglykosylierung. Da die Amöben außerdem keine Zellwand haben, ist die Aufarbeitung einfacher als bei Hefen (Slade *et al.*, 1997).

Auf Grund der vielen Vorteile wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche durchgeführt, die humane DDAH-2 in *D. discoideum* rekombinant herzustellen. Dabei standen zwei Plasmide zur Verfügung, mit denen N- bzw. C-terminal GFP-fusionierte hDDAH-2 hergestellt werden konnte. Dadurch wurde eine einfache fluoreszenzmikroskopische Analyse der Proteinbildung in den Zellen möglich.

Vor der Klonierung der Plasmide wurden erst einmal Lysate von Wildtypamöben mit DDAH-Antikörpern untersucht (s. 2.4.5.1). Dabei waren mit den Antikörpern keine störenden, endogenen Proteine nachweisbar, deren Sequenz denen der hDDAH-Proteine ähnelte. Bei der Mikroskopie wurden keine morphologischen Unterschiede

zwischen Wildtyp- und transformierten Amöben durch die heterologe Proteinexpression entdeckt (s. 2.4.5.2 Abbildung 2.42 linke Seite). Anders sah es aus, wenn die Zellen auf Fluoreszenz untersucht wurden. Die mit GFP-Leerplasmiden transformierten Zellen fluoreszierten sehr deutlich im Vergleich zu den Wildtyp-Amöben (s. 2.4.5.2 Abbildung 2.42 rechte Seite). In Übereinstimmung mit der Literatur (Levi *et al.*, 2000) konnte die GFP-Bildung in diesen Amöben, aber nicht in Wildtyp-Amöben nachgewiesen werden (s. 2.4.5.2 Abbildung 2.43). Die stärkere GFP-Bildung in Amöben mit dem Leerplasmid für C-terminales GFP, ließ sich durch die Co-Transformation des pREP-Plasmids erklären. Das Plasmid steigert nach Levi *et al.*, 2000 einerseits die Replikationsrate von Genen deutlich und erhöht andererseits die Zellbildung um das 50-100fache.

Bei den Amöben, die DDAH-GFP-Fusionsproteine bilden sollten, fluoreszierten nur die Amöben mit dGFP-hDDAH-2 stärker als die Wildtyp-Amöben. Die detektierte Fluoreszenz korrelierte jedoch nicht mit den Ergebnissen der Blot-Analysen. Es konnte wiederholt keine Bildung von Fusionsproteinen im Lysat nachgewiesen werden (s. 2.4.5.2 Abbildung 2.43), weder mit Antikörpern gegen hDDAH-2 noch gegen GFP. Eine Bildung von hDDAH-2-dGFP war bereits nach der Fluoreszenzmessung als fehlgeschlagen betrachtet worden. Das völlige Fehlen von dGFP-hDDAH-2 oder Abbruchprodukten, die die detektierte Fluoreszenz in den entsprechenden Amöben erklären könnten, überraschte dagegen. Die Fluoreszenz deutete auf eine GFP-Bildung hin, die jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Probleme bei der hDDAH-2-Herstellung in *D. discoideum* lassen sich auf den hohen A+T-Gehalt des Genoms (Eichinger *et al.*, 2005) und die daraus resultierende *codon usage* zurückführen (Sharp & Devine, 1989). Die humane DDAH-2 hat einen G+C-Gehalt von ca. 65 %, das Genom der Amöben nur von ca. 22 %. Außerdem war bekannt, dass Gene mit mehr als 20 % seltener Codons (G an Position drei des Triplets) kaum in *D. discoideum* exprimierbar sind (Slade *et al.*, 1997). Der Gehalt dieser seltenen Codons liegt in hDDAH-2 bei ca. 30 %. Eine Herstellung der hDDAH-2 ohne eine Optimierung der DNA-Sequenz auf A+T-reiche Codons zur genetischen Verschlüsselung der Aminosäuren ist daher im gewählten Wirt nicht möglich. Dadurch

2. Rekombinante Herstellung der humanen DDAH-2

ließ sich auch nicht klären, ob die hDDAH-2 posttranslationale Modifikationen für Löslichkeit und Aktivität benötigt, die in *E. coli* nicht möglich sind.

2.6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Isoformen-Selektivität der von uns entwickelten DDAH-Inhibitoren (Kotthaus *et al.*, 2008) untersucht werden. Dafür wurden beide hDDAH-Enzyme in gereinigter Form benötigt. Für hDDAH-1 gab es im Arbeitskreis ein etabliertes Verfahren für die rekombinante Herstellung und Reinigung mit Hilfe von *E. coli*. Eine analoge Herstellung der hDDAH-2 in *E. coli* oder anderen Wirtssystemen war zuvor nicht gelungen (Kotthaus, 2008; Altmann, 2009). Das Enzym war darüber hinaus nicht käuflich zu erwerben und die Reinigung des aktiven nativen Enzyms aus Gewebe gescheitert (Knipp, 2007). Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit zuerst ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung der hDDAH-2 gesucht. Mit Hilfe verschiedener Fusionspartner wurde das Protein in *E. coli* und *Dictyostelium discoideum* unter Variation der Expressionsbedingungen gebildet. Die Reinigung erfolgte, wenn möglich, über den His-*tag* des jeweiligen Fusionsproteins an Ni²⁺-NTA. Die Aktivität der rekombinanten hDDAH-2-Fusionsproteine wurde im Vergleich zur hDDAH-1 mit den Substraten L-NMMA, ADMA, SMTC und *N*^ω-Amino-L-arginin untersucht.

Entgegen den Ergebnissen von Leiper *et al.*, 1999 und Nandi *et al.*, 2012 war es in dieser Arbeit nicht möglich aktive hDDAH-2 in *E. coli* herzustellen und zu reinigen. Die Herstellung und partielle Anreicherung des Proteins an Ni²⁺-NTA war möglich, eine Hydrolyse des Substrates ADMA konnte jedoch nicht beobachtet werden. Für eine hDDAH-2 mit modifiziertem Abstand zwischen His-*tag* und Linker, konnte keine Reinigung erreicht werden, obwohl das Protein der von Leiper gebildeten DDAH-2 stark ähnelte.

Weitere Modifikationen wie die Art und Positionierung der Affinitäts-*tags* verbesserte die Reinigung der hDDAH-2-Fusionsproteine nicht. Die Verwendung anderer *E. coli*-Stämme zur Proteinherstellung und die Coexpression von Faltungsmodulatoren führten nicht zur Erhöhung des löslichen Anteils von hDDAH-2. Die Faltung der hDDAH-2 in den nativen Zustand konnte mit GFP als "Faltungsreporter" nicht erbracht werden,

da zu wenig hDDAH-2-GFP und gar kein hDDAH-1-GFP für vergleichende Studien in *E. coli* gebildet wurde. Da in *Dictyostelium discoideum* keine hDDAH-2 gebildet wurde, ließ sich ein Bedarf an posttranslationalen Modifikationen für Löslichkeit und Aktivität des Proteins nicht prüfen.

Mit der Herstellung einer N-terminal His-getaggen hDDAH-2 nach der Vorschrift von Leiper *et al.*, 1999 ließ sich dennoch das Postulat der Gruppe überprüfen. Im Gegensatz zur rekombinant hergestellten hDDAH-1, setzten weder die von uns noch die nach der Publikation von Leiper hergestellte hDDAH-2 in *E. coli*-Lysaten eines der getesteten Substrate um. Dasselbe Ergebnis zeigte sich bei gereinigter GroEL-fusionierter hDDAH-2. Damit konnten die Daten von Leiper *et al.*, 1999 zur hDDAH-2-Aktivität nicht reproduziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit denen anderer Forscher (Knipp, 2007; Walter Fast, Texas, persönliche Kommunikation) sprachen deutlich für das Fehlen einer intrinsischen, hydrolytischen Aktivität der hDDAH-2 für Methylarginine. Eine Klärung dieser Frage ermöglichen aber nur Studien am nativen Enzym, die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführt wurden.

3. Studien an nativer, porciner DDAH

3. Studien an nativer, porciner DDAH

3.1 Einleitung

3.1.1 Studien zur Beteiligung der DDAH-2 am Methylarginin-Metabolismus

Die wichtige Rolle der DDAH-1 im Abbau asymmetrisch methylierter Arginine und der daraus folgende Einfluss der DDAH-1 auf den NO-Metabolismus wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt (Dayoub *et al.*, 2003; Konishi *et al.*, 2007). Der Identifizierung des Enzyms als therapeutisches Angriffsziel im NO-Stoffwechsel folgte die Entwicklung von DDAH-Inhibitoren und die Analyse ihrer Selektivität gegenüber anderen Enzymen des NO-Stoffwechsels (Rossiter *et al.*, 2005; Lluís *et al.*, 2011; Kotthaus *et al.*, 2011a). In Ermangelung einer reinen und aktiven DDAH-2 konnten die DDAH-Inhibitoren jedoch bis heute noch nicht auf ihre Isoformen-Selektivität hin getestet werden.

Der Einfluss von DDAH-Inhibitoren auf die DDAH-1-Aktivität wurde über die Veränderung der L-Citrullin-Bildung aus L-NMMA oder ADMA charakterisiert (Kotthaus *et al.*, 2008). Inwieweit dieses Vorgehen auch auf die DDAH-2 übertragen werden kann, war aus der Literatur nicht ersichtlich.

Leiper und Kollegen identifizierten die DDAH-2 durch *in silico* Methoden als Isoenzym der DDAH-1 und postulierten die endogene, hydrolytische Enzymaktivität der DDAH-2 für die methylierten Arginine durch Analyse von *E. coli*-Lysaten, in denen rekombinant vermehrt hDDAH-2 gebildet wurde (Leiper *et al.*, 1999).

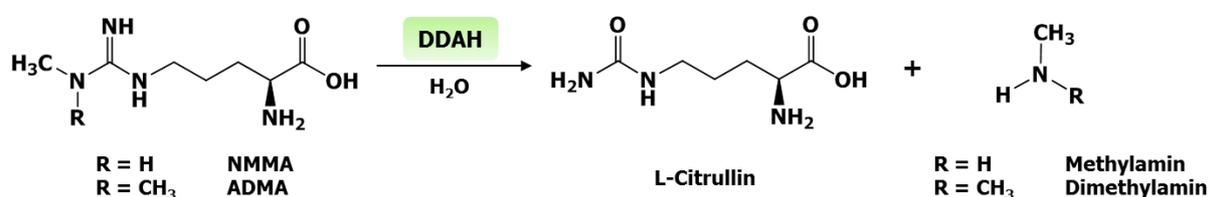


Abbildung 3.1: Postulierter Metabolismus für DDAH-Enzyme

ADMA: *N*^ω,*N*^{ω'}-Dimethyl-L-arginin. DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase.
L-NMMA: *N*^ω-Monomethyl-L-arginin.

Weitere indirekte Belege für diese Hypothese lieferten einige Zellkulturstudien und Studien an der transgenen DDAH-2-Maus, bei denen jeweils Veränderungen der ADMA-Konzentrationen und der DDAH-Aktivität mit der DDAH-2-Bildung korreliert wurden (Achan *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2007; Garbin *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Sakurada *et al.*, 2008). Demnach sollte sich der Einfluss von DDAH-Inhibitoren auf die DDAH-2-Aktivität genauso wie für die DDAH-1 prüfen lassen und so Aussagen über die Isoformen-Selektivität der DDAH-Inhibitoren möglich sein.

Leiper's Postulat wurde jedoch bereits zu Beginn dieser Arbeit erstmals kontrovers diskutiert. Einerseits war es weder in vorherigen Untersuchungen im Arbeitskreis noch im ersten Teil dieser Arbeit gelungen, eine aktive rekombinant hergestellte DDAH-2 zu gewinnen (s. 2.4.1.3 und 2.4.2.3), obwohl das verwendete Wirtssystem zur Herstellung der DDAH-2, die Fusions-*tags* und der Abstand zwischen DDAH-2 und Fusions-*tag* variiert wurden (Kotthaus, 2008; Altmann, 2009). Andererseits ergaben sich aus den Arbeiten anderer Wissenschaftler, unter anderem zur Aktivität der gereinigten nativen DDAHs, berechnete Zweifel an der Theorie der Methylarginin-Umsetzung durch DDAH-2 (Knipp, 2007; Wang *et al.*, 2007; Pope *et al.*, 2009b). Darüber hinaus stand der Beweis des Postulats von Leiper und Kollegen am reinen, rekombinant hergestellten Enzym, trotz der Zugänglichkeit der DDAH-2 für eine Affinitätschromatographische Aufreinigung über den Histidin-*tag* des Fusionsproteins, bis zum Beginn dieser Arbeiten aus.

3.1.2 Zielsetzung der Arbeit

Da die postulierte hydrolytische Aktivität der DDAH-2 bisher weder am rekombinant hergestellten noch am nativen, gereinigten Enzym belegt werden konnte, sollte diese Umsetzung nun am nativen Enzym in seiner physiologischen Umgebung untersucht werden.

Dazu sollten einerseits in Studien an porcinen Geweben neue Informationen zur Lokalisation der DDAH-2 in verschiedenen Organen gewonnen werden und andererseits Gewebe identifiziert werden, die nur eine Isoform enthalten und so repräsentativ die Aktivitätsuntersuchung jeder DDAH-Isoform ermöglichen. Mit der Analyse der L-Citrullin-Bildung aus der Inkubation der Gewebe mit L-NMMA und ADMA sollte dann geklärt werden, ob die Untersuchung der Methylarginin-Umsetzung überhaupt

3. Studien an nativer, porciner DDAH

als Nachweis einer endogenen DDAH-2-Aktivität und somit zur Testung der Inhibitor-Selektivität geeignet ist.

Die Testung von alternativen DDAH-Substraten sollte zusätzlich Aufschluss über eine mögliche Substratselektivität der DDAH-Enzyme bringen und helfen potentielle Substrate der DDAH-2 zu identifizieren.

3.2 Material

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte findet sich in Kapitel 5 dieser Arbeit.

3.3 Methoden

3.3.1 Präparation subzellulärer Fraktionen aus porcinen Geweben

Für die Arbeit wurden die Schweineschilddrüsen von einer Großschlachterei (Rüdiger Thomsen EG-Großschlachterei GmbH & Co. oHG, Kellinghusen) und alle anderen Gewebe von einem Schlachthof (Schlachterei Neidhard, Holtsee) bezogen. Ein Teil der verwendeten subzellulären Fraktionen aus verschiedenen Schweinegeweben wurden mir freundlicherweise von Frau Krischkowski (Niere, Leber, Gehirn, Lunge, Fett, Milz) und Frau Dr. Havemeyer (Schilddrüse, Herz), Kiel, zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden subzelluläre Fraktionen von Schilddrüse und Milz selbstständig bei 4 °C präpariert.

Die Gewebe wurden zur Präparation der Zellfraktionen zerteilt, gewaschen und in TPWL-Puffer (s. 5.9.8) homogenisiert. Die Homogenate wurden drei- bis viermal bei $600 \times g$ für 15 min zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde durch eine weitere Zentrifugation bei $9.400 \times g$ für 20 min in ein Pellet (Gewinnung von Mitochondrien) und einen Überstand (Mikrosomen und Cytosol) aufgeteilt. Die Mitochondrien wurden aus dem Pellet der Zentrifugation mittels Dichtegradientenzentrifugation in einem isotonischen Percoll-Gradienten nach der Methode von Hovius *et al.*, 1990 gewonnen, wobei das Verfahren nach Clement *et al.*, 2005 modifiziert wurde. Der $9.400 \times g$ -Überstand wurde für die Isolation von Mikrosomen ein weiteres Mal bei $205.000 \times g$ für 70 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in TPWL-Puffer ohne BSA durch Resuspendieren und erneutes Zentrifugieren gewaschen und nach Resuspension in Puffer ohne BSA bei -80 °C gelagert. Der Überstand der $205.000 \times g$ -Zentrifugation wurde nochmals bei $205.000 \times g$ für 70 min zentrifugiert, um nur den cytosolischen Überstand abzutrennen. Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde wie im Kapitel 2.3.2.4.2 beschrieben bestimmt. Darüber hinaus wurde durch den Nachweis der Reduktion von

3. Studien an nativer, porciner DDAH

Benzamidoxim in allen Gewebesubfraktionen (Clement *et al.*, 2005) das grundsätzliche Vorhandensein von Enzymaktivität in den präparierten Geweben und damit ihre Eignung für Aktivitätsstudien belegt (Krischkowski, 2010).

3.3.2 Immunoblot-Analysen

Die Ermittlung der Spezifität der DDAH-Antikörper an 0,05-2 µg gereinigter, rekombinant hergestellter DDAH erfolgte wie unter 2.3.2.6 beschrieben.

Der spezifische Nachweis von Proteinen in den porcinen Subfraktionen erfolgte mittels Western Blot-Analyse (s. 2.3.2.6) nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Proben mit 10-16 µg Gesamtproteingehalt auf 12,5 %igen SDS-Gelen (s. 2.3.2.5). In Abweichung zu der im Kapitel 2.3.2.6 beschriebenen Methode wurden die Transferzeit beim Elektrobplot für einen optimalen Proteinübertrag auf 2,5 h erhöht und die verwendeten Primärantikörpern in einer Verdünnung von 1:2.000-1:50.000 eingesetzt.

3.3.3 Messung der DDAH-Aktivität in porcinen Geweben

Die Bestimmung der DDAH-Aktivität im porcinen Gewebe erfolgte in Anlehnung an die Methode von Tain & Baylis, 2007 mit Bestimmung des gebildeten L-Citrullins in Anlehnung an Knipp & Vasák, 2000. Die Proben wurden in einer Dreifachbestimmung pro Assay untersucht. Bei jeder Untersuchung wurden Kontrollinkubationen mit rekombinant hergestellter hDDAH-1 durchgeführt, um die korrekte Durchführung des Aktivitätsassays zu belegen.

3.3.3.1 Standardassay zur Vermessung der DDAH-Aktivität im Gewebe

Für die Aktivitätsbestimmung im Gewebe wurden zuerst 1,2 mg Homogenat oder Cytosol in 240 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 mit 100 U Urease/ml Gewebe in Eppendorfreaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurden dem Inkubationsansatz das Substrat ADMA in einer Endkonzentration von 300 µM oder ein äquivalentes Volumen an Puffer zugefügt und für 60 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 4 %iger Sulfosalicylsäure im Verhältnis 1:1 zum Volumen des Inkubationsansatzes. Die Ansätze wurden für 10 min bei 9250 × *g* zentrifugiert,

100 µl der Überstände in hitzestabile 96-well Mikrotiterplatten pipettiert und das gebildete L-Citrullin wie im Kapitel 2.3.6.2.2 beschrieben derivatisiert. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Achtpunkt-Kalibrierung von 0-120 µM L-Citrullin durchgeführt. Die Ergebnisse der L-Citrullin-Bildung in substrathaltigen Gewebeproben wurden immer um die L-Citrullin-Bildung der reinen Gewebe korrigiert.

3.3.3.2 Einfluss von Urease auf die DDAH-Aktivität

Für die Untersuchung eines Urease-Einflusses auf die DDAH-Aktivität wurden 4 µg rekombinant hergestellter hDDAH-1 unter Zusatz von Urease oder einem äquivalenten Volumen Kaliumphosphat-Puffer wie unter 3.3.3.1 beschrieben inkubiert und die L-Citrullin-Bildung gemessen. Als Substrat wurde für den Assay L-NMMA in einer Endkonzentration von 300 µM verwendet.

3.3.3.3 Hemmung der endogenen DDAH-Aktivität

Um den kausalen Zusammenhang zwischen der endogenen DDAH-Aktivität und der L-Citrullin-Bildung im Gewebe zu untersuchen, wurden 1,2 mg Nieren- bzw. Gehirnhomogenat allein oder mit 1 mM N^{ω} -(2-methoxyethyl)-L-arginin (L-257) vorinkubiert (s. 3.3.3.1). Nach Zusatz des Substrates ADMA wurde die L-Citrullin-Bildung aller Ansätze als Maß für die endogene DDAH-Aktivität gemessen. Durch Inkubation von 4 µg rekombinant hergestellter hDDAH-1 mit und ohne Inhibitor wurde die Hemmwirkung des Inhibitors auf DDAH belegt.

3.3.3.4 Umsetzung postulierter und alternativer DDAH- Substrate

In weiteren Experimenten wurde die Umsetzung verschiedener Substrate durch porcine Cytosole untersucht. Dazu wurden Nieren- und Schilddrüsencytosol wie unter 3.3.3.1 beschrieben mit L-NMMA, ADMA, *S*-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und N^{ω} -Amino-L-arginin jeweils in einer Endkonzentration von 1 mM inkubiert und die L-Citrullin-Bildung detektiert.

3.3.3.5 Einfluss von porcinen Geweben auf die Aktivität reiner, rekombinant hergestellter hDDAH-1

Für die Untersuchung des Einflusses von porcinen Geweben auf die hDDAH-1-Aktivität wurden jeweils 4 µg rekombinant hergestellter hDDAH-1 und 1,2 mg

3. Studien an nativer, porciner DDAH

Homogenat mit ADMA als Substrat wie unter 3.3.3.1 beschrieben inkubiert und die L-Citrullin-Bildung gemessen. Im Vergleich dazu wurde die L-Citrullin-Bildung von 4 µg rekombinant hergestellter hDDAH-1 unter Zusatz von 1,2 mg jedes Homogenats unter den gleichen Bedingungen ermittelt und um die basale zelluläre DDAH-Aktivität korrigiert. Die resultierende hDDAH-1-Aktivität bei Gewebezusatz wurde als relative DDAH-Aktivität in Bezug auf die Aktivität des reinen Enzyms (definiert als 100 %) angegeben.

3.3.3.6 L-Citrullin-Verbrauch in porcinen Geweben

Für die Untersuchung des L-Citrullin-Verbrauchs im porcinen Gewebe wurden 1,2 mg Homogenat mit 100 µM L-Citrullin ohne Substratzusatz wie unter 3.3.3.1 beschrieben inkubiert und die L-Citrullin-Bildung gemessen. Ein Inkubationsansatz mit 100 µM L-Citrullin ohne Gewebezusatz wurde als Standard ebenso wie die Proben inkubiert und vermessen.

3.3.3.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung von zwei miteinander zu vergleichenden Parametern fand der zweiseitige t-Test Anwendung. Der p-Wert für signifikante Unterschiede wurde auf $p = 0,05$ festgelegt.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Vorkommen und subzelluläre Lokalisation der DDAH-1 und DDAH-2 in porcinen Geweben

Bevor die Aktivität der nativen DDAH-Enzyme im porcinen Gewebe untersucht werden konnte, mussten das Vorkommen und die Verteilung der DDAH-Isoformen in den Geweben mittels Western Blot geklärt werden (s. 3.3.2). Dabei war es für weitere Studien von besonderem Interesse Organe zu finden, die durch eine dominantere oder sogar alleinige Bildung einer DDAH-Isoform repräsentativ für die Untersuchung der Eigenschaften dieser Isoform waren. Die Spur des Markers (meist in der Mitte) wurde aus der Darstellung aller Blots entfernt.

3.4.1.1 Ermittlung der Spezifität der DDAH-Antikörper

Da im Gewebe von Säugetieren beide DDAH-Isoformen im gleichen Organ vorkommen können, musste zuerst die Spezifität der verwendeten Antikörper für die DDAH-Isoformen überprüft werden, um falsch positive Ergebnisse bei der DDAH-Detektion zu vermeiden. Bei den eingesetzten Antikörpern handelte es sich um polyklonale Antikörper, die gegen die humanen DDAHs gerichtet waren.

Für die Untersuchung der Antikörper-Spezifität wurden 0,05-2 µg Gesamtprotein vom Eluat jeder gereinigten, rekombinant hergestellten humanen DDAH-Isoform auf einer PVDF-Membran mit Anti-DDAH-1- bzw. Anti-DDAH-2-Antikörpern auf das Auftreten von Signalen untersucht (s. Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Für hDDAH-2 wurde anfangs denaturierend gereinigtes Protein eingesetzt (s. 2.3.2.1.2), da diese Form in hoher Reinheit und größerer Menge für Studien vorhanden war. Erst im späteren Verlauf der Arbeit war es möglich, die Antikörper an nativ gereinigtem Protein zu testen.

3. Studien an nativer, porciner DDAH

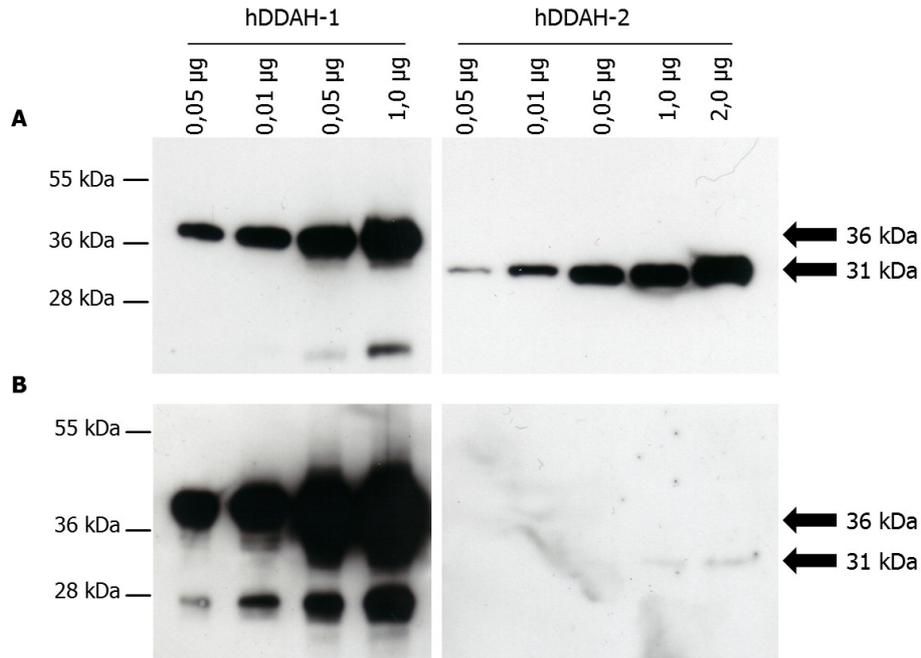


Abbildung 3.2: Western Blot-Analyse der Spezifität des DDAH-1-Antikörpers.

Es wurden wie angegeben 0,05-2 µg jeder DDAH pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-1 (1:50.000) detektiert. **Blot A:** denaturierend gereinigte hDDAH-2. **Blot B:** nativ gereinigte hDDAH-2. hDDAH-1 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa detektiert; hDDAH-2 bei ca. 31 kDa.

Der Anti-DDAH-1-Antikörper detektiert denaturierend gereinigte hDDAH-2 bereits ab 0,05 µg (s. Abbildung 3.2 A) während bei der Analyse nativ gereinigter hDDAH-2 ab 1,0 µg schwache Signale detektiert wurden (s. Abbildung 3.2 B). Für hDDAH-2 wurde nur eine Bande bei ca. 31 kDa detektiert, während für hDDAH-1 bei ca. 37 kDa eine Bande für das Voll-Längenprotein detektiert wurde und noch eine weitere Bande bei ca. 24 kDa (Blot A) bzw. 27 kDa (Blot B) für ein hDDAH-1-Fragment. Da die detektierten Signale für native hDDAH-2 im Vergleich zu denen der hDDAH-1 extrem schwach waren, wurde der Antikörper als ausreichend spezifisch für die Detektion von DDAH-1 angesehen.

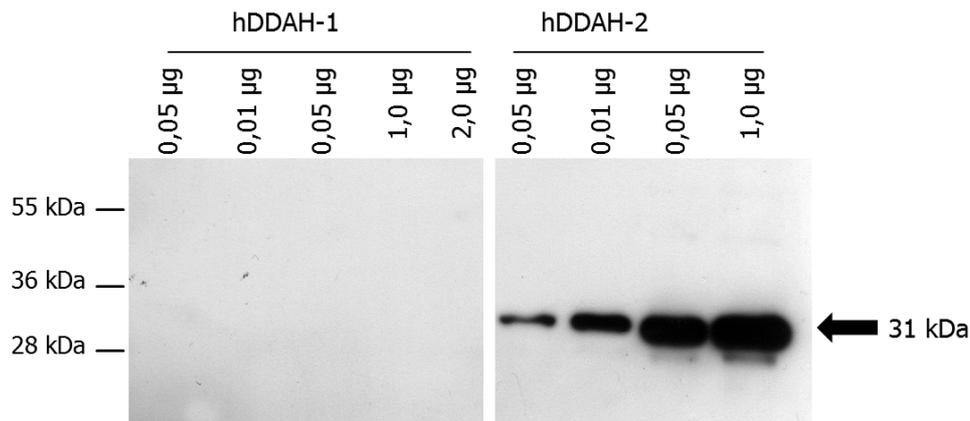


Abbildung 3.3: Western Blot-Analyse der Spezifität des DDAH-2-Antikörpers.

Es wurden wie angegeben 0,05-2 µg (Gesamtprotein) hDDAH-1 bzw. denaturierend gereinigte hDDAH-2 pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-2 (1:50.000) detektiert. hDDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert.

Der Anti-DDAH-2-Antikörper erkannte nur denaturierend gereinigte hDDAH-2 (bei ca. 31 kDa) ab 0,05 µg während kein Signal für nativ gereinigte hDDAH-1 detektiert wurde (s. Abbildung 3.3). Der Antikörper war daher spezifisch für die Detektion von DDAH-2.

3.4.1.2 Detektion von DDAH im porcinen Cytosol

Um mehr Informationen über die Verteilung der DDAH-Isoformen im Schwein zu bekommen, wurden Cytosole aller verfügbaren Gewebe mit den zuvor getesteten Anti-DDAH-Antikörpern per Western Blot auf ein DDAH-Vorkommen untersucht. Bei jedem Western Blot wurden Kontrollproteine für den jeweils verwendeten Primärantikörper auf dem Blot mit entwickelt, um die korrekte Durchführung der immunologischen Detektion zu dokumentieren.

Zuerst wurden Cytosole verschiedener porciner Gewebe mit dem Anti-DDAH-2-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich untersucht. Dabei wurden mehrere potentielle Banden für DDAH-2 detektiert. Die Verwendung von Anti-DDAH-2-Peptid-Antikörpern (Santa Cruz, Abgent) zur spezifischen Ermittlung der DDAH-2-Bande über einen Präblock der Antikörper mit dem Immunisierungs-Peptid, war auf Grund fehlender Detektion der DDAH-2 durch die Antikörper in den Cytosolen wiederholt nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Daher wurden zur Ermittlung der spezifischen DDAH-2-

3. Studien an nativer, porciner DDAH

Bande Vergleichsuntersuchungen an einem Teil der Proben mit und ohne Zusatz des Anti-DDAH-2-Antikörpers von Sigma-Aldrich durchgeführt (s. Abbildung 3.4).

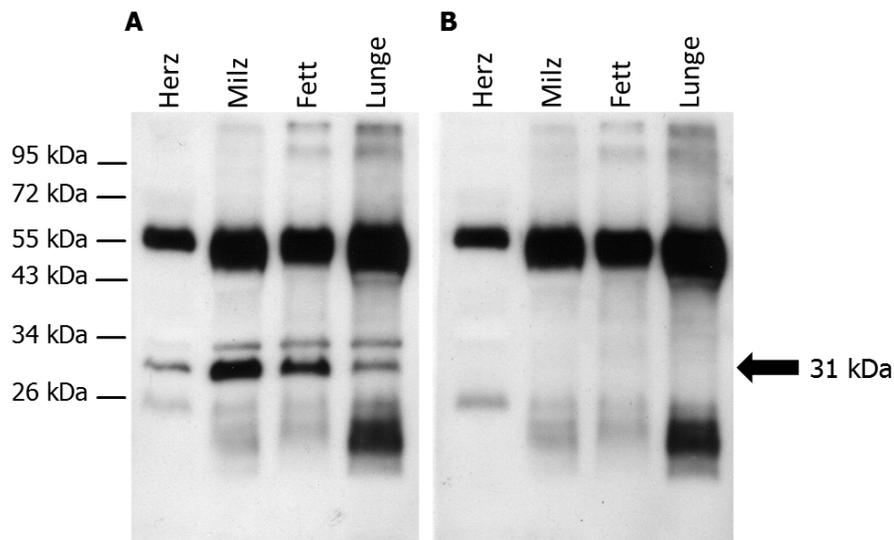


Abbildung 3.4: Western Blot zur Detektion von DDAH-2 in porcinen Cytosolen.

Es wurden 16 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-2 (1:5.000) und Sekundärantikörper im **Blot A** detektiert. Im **Blot B** wurden die Proben nur mit Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen, 1:10.000) entwickelt. Eine potentielle Bande für DDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert.

Die Entwicklung der Proben mit Anti-DDAH-2 und Sekundärantikörper lieferte Banden bei ca. 24 kDa, 31 kDa, 34 kDa und 55 kDa (s. Abbildung 3.4 A). Wurden die Proben nur mit dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen aus der Ziege entwickelt, zeigten sich bereits die Banden bei 24 kDa und 55 kDa (s. Abbildung 3.4 B). Bei diesen Banden handelte es sich den Ergebnissen nach um porcine Proteine, die nicht spezifisch durch den Sekundärantikörper erkannt wurden. Um sicher zu zeigen, dass die unspezifische Detektion der Proteine vom Sekundärantikörper abhängig war und die DDAH-2 Verteilung der Gewebe sicher zu bestimmen, wurden die Proben aller Gewebe mit einem Anti-Kaninchen-Antikörper untersucht, der im Esel erzeugt wurde (s. Abbildung 3.5).

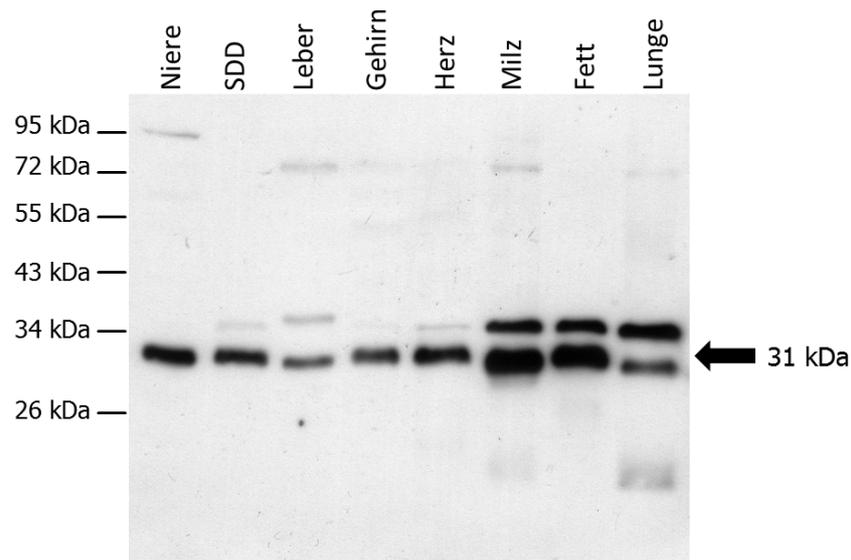


Abbildung 3.5: Western Blot zur Detektion von DDAH-2 in porcinen Cytosolen mit Esel-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper.

Es wurden 16 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-2 (1:10.000) und Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:10.000) entwickelt. Eine Bande für DDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert. SDD: Schilddrüse.

Eine Probe des Esel-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers wurde mir freundlicherweise von Prof. Herdegen, Kiel zur Verfügung gestellt. Bei der Untersuchung aller Cytosole mit dem Esel-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper wurde nur die 31 kDa Bande in allen Cytosolen detektiert (s. Abbildung 3.5). Das ca. 34 kDa große Protein wurde nur in einem Teil der Proben und mit unterschiedlicher Intensität detektiert. Dabei korrelierte die Intensität der 34 kDa Bande im Vergleich der Proben untereinander nicht mit der der 31 kDa Bande, was ein Hinweis darauf war, dass es sich bei dem Signal bei 34 kDa um eine nicht-spezifische Detektion von Proteinen durch den Anti-DDAH-2-Antikörper handelte.

Die Untersuchung aller Cytosole mit dem Anti-DDAH-2-Antikörper zeigte, dass DDAH-2 in allen porcinen Geweben gebildet wird. Dabei wurde am meisten DDAH-2 im Cytosol der Milz, des Fettgewebes, der Niere und des Herzens detektiert. Zur Bestimmung des DDAH-1-Vorkommens in den Geweben wurden die Cytosole auch mit dem Anti-DDAH-1-Antikörper untersucht (s. Abbildung 3.6).

3. Studien an nativer, porciner DDAH

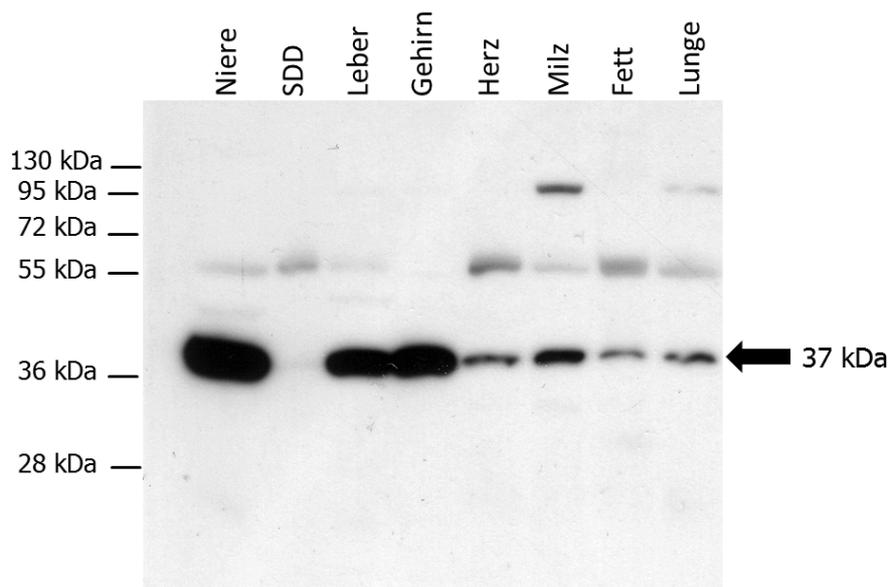


Abbildung 3.6: Western Blot zur Detektion von DDAH-1 in porcinen Cytosolen.

Es wurden 16 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-1 (1:50.000) und Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:10.000) entwickelt. Eine Bande für DDAH-1 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa detektiert. SDD: Schilddrüse.

Bei der Untersuchung der Cytosole auf das Vorkommen von DDAH-1 wurden erneut die Proteinbanden bei ca. 55 kDa detektiert, die durch Verwendung des Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers aus der Ziege auftraten. Darüber hinaus wurde die DDAH-1 bei 37 kDa klar detektiert. Das Enzym wurde sehr stark in den Cytosolen der Niere, der Leber und des Gehirns nachgewiesen aber nur schwach im Cytosol von Herz, Milz, Fett und Lunge. Anders als bei der DDAH-2 wurde die DDAH-1 im Cytosol der porcinen Schilddrüse (SDD) gar nicht detektiert, so dass die Schilddrüse erstmals als ein Organ identifiziert wurde, dass exklusiv DDAH-2 enthält.

3.4.1.3 Subzelluläre Lokalisation der DDAH in porcinen Geweben

Zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation der DDAH-Isoformen wurden jeweils Homogenat, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol eines Gewebes per Western Blot (s. 3.3.2) auf das Vorkommen der DDAHs untersucht. Basierend auf den ermittelten Organverteilungen der DDAH-Enzyme im porcinen Gewebe (s. 3.4.1.2) wurde die Lokalisation der DDAH-1 im Hirngewebe untersucht (s. Abbildung 3.7) und die Lokalisation der DDAH-2 im Schilddrüsengewebe (s. Abbildung 3.8).

Um außerdem die Reinheit der zellulären Subfraktionen beurteilen zu können, wurden Western Blots mit Antikörpern gegen Markerproteine der entsprechenden Subfraktionen durchgeführt. Dazu wurde ein Antikörper gegen das mitochondriale VDAC Protein verwendet (*voltage dependent anion channel*). Dieses Protein bildet einen Kanal auf der äußeren Mitochondrienmembran über den der Austausch mitochondrialer Metabolite kontrolliert wird (Zalk *et al.*, 2005). Als Marker der Mikrosomen wurde ein Antikörper gegen Calnexin, das als Chaperon auf dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, eingesetzt (Vassilakos *et al.*, 1996). Das cytosolische Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) wurde als Marker für das Cytosol verwendet (Sirover, 2012).

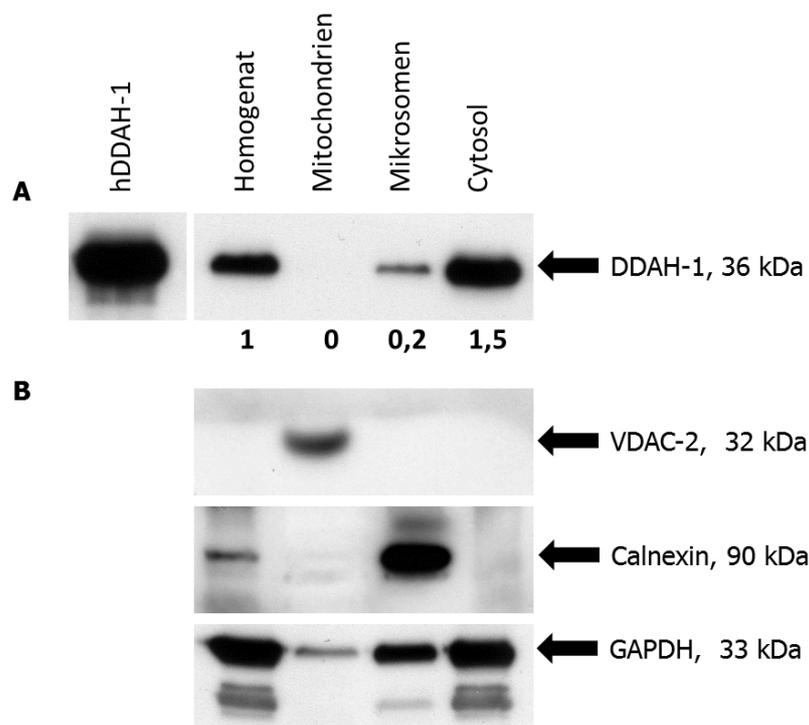


Abbildung 3.7: Western Blot-Analyse der subzellulären Fraktionen des Gehirns.

Es wurden 0,2 µg humane rekombinant hergestellte DDAH-1 oder 16 µg Gesamtprotein jeder Subfraktion des Gehirns pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-1-Antikörper (1:50.000) entwickelt (**Blot A**). Eine Bande für DDAH-1 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa detektiert. Die Zahlen indizieren die Verhältnisse des DDAH-1-Gehaltes der Gewebe bezogen auf das Homogenat (Quantifizierung mit Lumi ImagerTMF1). **Blot B:** Die Reinheit der Subfraktionen wurde mit folgenden Antikörpern ermittelt: Anti-VDAC-2 (1:2.000), Anti-Calnexin (1:10.000) und Anit-GAPDH (1:1.000).

Bei der Untersuchung der subzellulären Fraktionen des Gehirns wurde die DDAH-1 wie erwartet im Homogenat und im Cytosol detektiert (s. Abbildung 3.7 A). Dabei

3. Studien an nativer, porciner DDAH

war die DDAH-1 im Cytosol um den Faktor 0,5 im Verhältnis zum Homogenat angereichert. Außerdem wiesen die porcine DDAH-1 und das rekombinante humane Protein dasselbe Molekulargewicht auf.

In geringer Menge ließ sich die DDAH-1 auch in Mikrosomen nachweisen. Der Anti-GAPDH-Blot zeigte, dass die Mikrosomen und weniger die Mitochondrien Cytosol enthielten (s. Abbildung 3.7 B, unterer Blot). Daher war zu erwarten, dass DDAH-1 auch in den Mikrosomen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus waren die Mitochondrien und Mikrosomen nicht crosskontaminiert, was sich daran ableiten ließ, dass die Markerproteine jeder Fraktion nur in der jeweiligen Fraktion oder wie erwartet im Homogenat des Gewebes detektierbar wurden (s. Abbildung 3.7 B, erster und zweiter Blot).

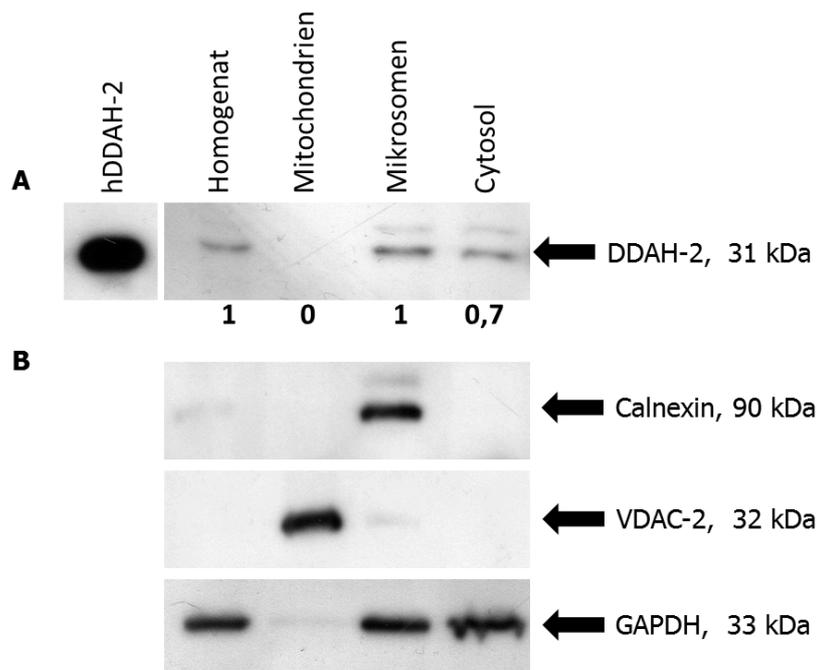


Abbildung 3.8: Western Blot-Analyse der subzellulären Fraktionen der Schilddrüse.

Es wurden 0,05 µg denaturierend gereinigte, rekombinant hergestellte hDDAH-2 oder 16 µg Gesamtprotein jeder Subfraktion des Gehirns pro Spur aufgetragen und mit Anti-DDAH-2-Antikörper (1:5.000) entwickelt (**Blot A**). Eine Bande für DDAH-2 wurde bei einem Molekulargewicht von ca. 31 kDa detektiert. Die Zahlen indizieren die Verhältnisse des DDAH-2-Gehaltes der Gewebe bezogen auf das Homogenat (Quantifizierung mit Lumi ImagerTMF1). **Blot B:** Die Reinheit der Subfraktionen wurde mit folgenden Antikörpern ermittelt: Anti-VDAC-2 (1:2.000), Anti-Calnexin (1:10.000) und Anit-GAPDH (1:1.000).

Die Ergebnisse für die Detektion der DDAH-2 in den subzellulären Fraktionen der Schilddrüse ähnelten denen für die DDAH-1 im Gehirn. So konnte die DDAH-2 ebenfalls im Homogenat, in den Mikrosomen und im Cytosol detektiert werden (s. Abbildung 3.8 A). Dabei war die Detektion des Proteins in den Mikrosomen auf den Cytosol-Gehalt der Mikrosomen zurückzuführen (s. Abbildung 3.8 B, unterer Blot).

Im Gegensatz zur DDAH-1 war die DDAH-2 im Homogenat und den Mikrosomen mit der gleichen Intensität nachweisbar (beide Faktor 1), während im Cytosol (Faktor 0,7) keine Anreicherung der DDAH-2 erkennbar war (s. Abbildung 3.8 A). Auch die porcine DDAH-2 wies dabei dasselbe Molekulargewicht wie die denaturierend gereinigte, rekombinant hergestellte hDDAH-2 auf.

Aus den Blots war auch ersichtlich, dass die Mitochondrien nur minimal mit Cytosol und in keinsten Weise mit Mikrosomen crosskontaminiert waren (s. Abbildung 3.8 B).

3.4.2 DDAH-Aktivität in porcinen Geweben

Nachdem Vorkommen und subzelluläre Lokalisation der DDAH-Isoformen bestimmt waren, wurden photometrische Untersuchungen zur Aktivität der nativen DDAHs in porcinen Geweben durchgeführt (s. 3.3.3). Da bereits bei Kontrollinkubationen der Gewebe ohne Substrat eine Rosafärbung durch endogenes L-Citrullin resultierte, wurden nachfolgend bei allen Untersuchungen Gewebeproben ohne Substrat mit inkubiert (Probenblank) und die L-Citrullin-Bildung substrathaltiger Gewebeproben um die Werte der Probenblanks korrigiert. Kontrollinkubationen mit rekombinant hergestellter hDDAH-1 sicherten die korrekte Durchführung aller Assays.

3.4.2.1 Einfluss von Urease auf die DDAH-Aktivität

Bevor die DDAH-Aktivität in porcinen Geweben in Anlehnung an die Methode von Tain & Baylis, 2007 gemessen wurde, wurden Untersuchungen zu einem möglichen Einfluss der Urease auf die hydrolytische Aktivität der DDAH durchgeführt (s. 3.3.3.2). Dazu wurde hDDAH-1 mit und ohne Zusatz von Urease wie unter 3.3.3.1 beschrieben vorinkubiert. Nach Zusatz von L-NMMA bzw. Puffer wurden die Ansätze bei 37 °C inkubiert und die DDAH-Aktivität als L-Citrullin-Bildung in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein gemessen (s. Abbildung 3.9). Eine Testung des Einflusses der Urease auf die

3. Studien an nativer, porciner DDAH

Aktivität rekombinant hergestellter hDDAH-2 war auf Grund fehlender hydrolytischer Aktivität des partiell gereinigten Enzyms nicht möglich (s. 2.4.1.3 und 2.4.2.3).

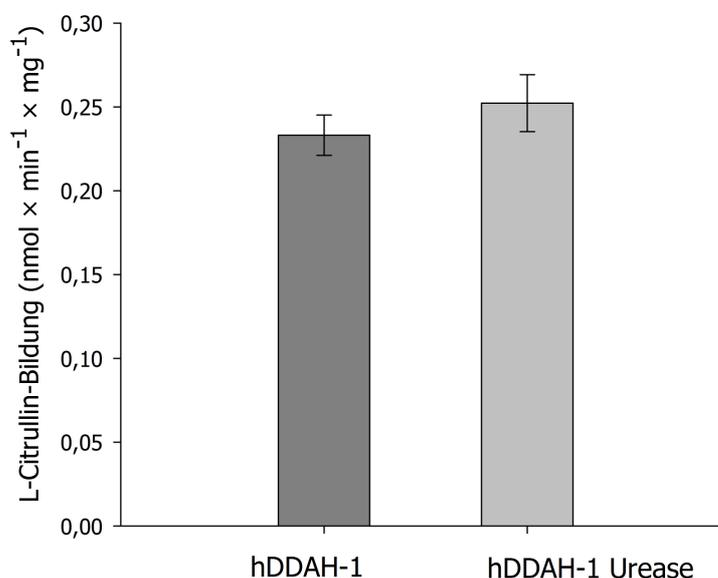


Abbildung 3.9: Einfluss von Urease auf die Aktivität humaner, rekombinant hergestellter DDAH-1.

Rekombinant hergestellte hDDAH-1 (4 µg) wurde mit und ohne Zusatz von 100 U Urease in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 345 µl) mit 300 µM L-NMMA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DDAH-Aktivität wurde als L-Citrullin-Bildung in nmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein gemessen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Studien, bei denen jeweils acht unabhängige Proben inkubiert und jede Probe dreifach vermessen wurde.

Die L-Citrullin-Bildung als Maß für die hydrolytische Aktivität der DDAH war bei der Untersuchung der hDDAH-1 mit und ohne Urease-Vorinkubation vergleichbar. Die direkte Vorinkubation des Enzyms mit Urease beeinflusste daher die hDDAH-1-Aktivität nicht negativ.

3.4.2.2 Ermittlung der DDAH-Aktivität in porcinen Geweben

Für die Untersuchung der Aktivität der DDAHs in ihrer nativen physiologischen Umgebung wurden Homogenate (s. Abbildung 3.10 B) bzw. Cytosole von sieben der zuvor getesteten Gewebe mit dem Substrat ADMA bei 37 °C inkubiert und nachfolgend wurde kolorimetrisch das gebildete L-Citrullin detektiert (s. 3.3.3.1). Auf Grund der geringen Verfügbarkeit wurde bei den Untersuchungen auf das Fettgewebe verzichtet, da alle Studien für eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer Charge des betreffenden Gewebes durchgeführt werden sollten.

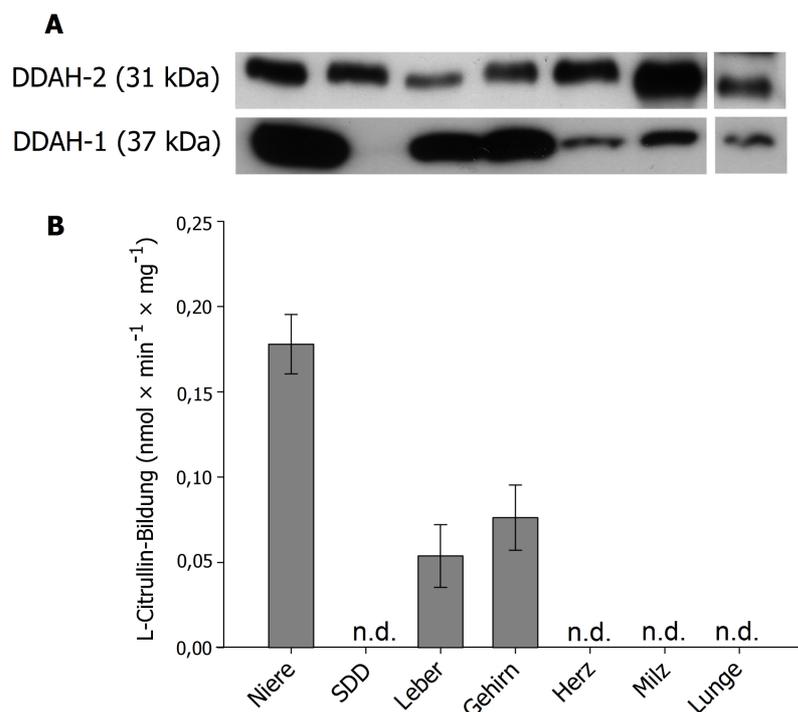


Abbildung 3.10: DDAH-Aktivität im porcinen Homogenaten in Korrelation mit dem Expressionsprofil der DDAHs in porcinen Geweben.

A: Zuvor ermitteltes Expressionsprofil der DDAH-Isoformen (s. 3.4.1.2).

B: Porcine Homogenate (1,2 mg) wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 340 μ l) mit 300 μ M ADMA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DDAH-Aktivität wurde als L-Citrullin-Bildung in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Gesamtprotein gemessen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus vier unabhängigen Studien, bei denen jede Probe dreifach vermessen wurde. n.d.: Nicht detektierbar (Detektionslimit: 0,02 $\text{nmol L-Citrullin min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). SDD: Schilddrüse.

Eine L-Citrullin-Bildung durch die DDAH-vermittelte Hydrolyse von ADMA konnte in den Homogenaten von Niere, Leber und Gehirn gefunden werden (s. Abbildung 3.10 B). Es wurde keine DDAH-Aktivität in Homogenaten bzw. Cytosolen (ohne Abbildung) der Schilddrüse (SDD), des Herzens, der Milz und der Lunge detektiert, obwohl dort DDAH-2 in großen Mengen zu finden war (s. Abbildung 3.10 A). Die etwas höheren Werte der L-Citrullin-Bildung im Cytosol (s. Tabelle 3.1) ließen sich mit der zuvor ermittelten Anreicherung der DDAH-1 im Cytosol erklären (s. Abbildung 3.7).

Organ	Aktivität Homogenat	Aktivität Cytosol
Niere	0,18 \pm 0,02	0,52 \pm 0,03
Leber	0,05 \pm 0,02	0,16 \pm 0,04
Gehirn	0,08 \pm 0,02	0,15 \pm 0,04

Tabelle 3.1: L-Citrullin-Bildung in den Geweben in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Gesamtprotein

3. Studien an nativer, porciner DDAH

Der Vergleich der DDAH-Aktivitäten mit dem DDAH-Vorkommen in den Geweben (s. Abbildung 3.10 A) zeigte, dass die L-Citrullin-Bildung als Maß für die DDAH-Aktivität direkt mit der Expression und dem Gehalt der DDAH-1 in den Geweben korrelierte. Die Aktivität korrelierte jedoch nicht mit der Expression der DDAH-2. Nur Gewebe mit hohem DDAH-1-Gehalt zeigten eine L-Citrullin-Bildung, wobei die Niere mit dem höchsten DDAH-1-Gehalt auch die höchste L-Citrullin-Bildung zeigte.

3.4.2.3 Hemmung der endogenen DDAH-Aktivität

Um zu zeigen, dass die in den Aktivitätsstudien untersuchte L-Citrullin-Bildung in den Geweben aus dem Abbau von ADMA durch die gewebeeigene DDAH stammt, wurde die L-Citrullin-Bildung in den Homogenaten von Niere und Gehirn alleine und in Anwesenheit des bekannten DDAH-Inhibitors N^{ω} -(2-methoxyethyl)-L-arginin (L-257) gemessen (s. Abbildung 3.11). Inkubationen mit rekombinant exprimierter hDDAH-1 dienten der Kontrolle des Inhibitors (s. 3.3.3.3).

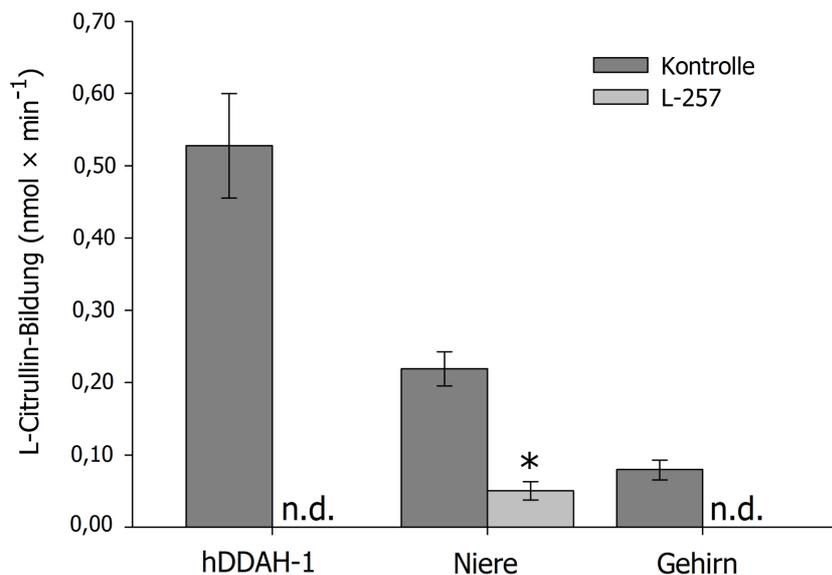


Abbildung 3.11: Hemmung der Aktivität humaner und porciner DDAH.

Porcine Homogenate (1,2 mg) und rekombinant hergestellte hDDAH-1 (4 µg) wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 350 µl) mit 300 µM ADMA und 1 mM des DDAH-Inhibitors L-257 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Inhibitor inkubiert. Die DDAH-Aktivität wurde als L-Citrullin-Bildung in nmol min⁻¹ gemessen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus vier unabhängigen Studien, bei denen jede Probe sechsfach vermessen wurde. n.d.: Nicht detektierbar (Detektionslimit: 0,02 nmol L-Citrullin min⁻¹). * : signifikanter Unterschied (P<0,05) zwischen Inhibitor- und Kontrollansatz.

Die aus der DDAH-Aktivität resultierende L-Citrullin-Bildung wurde sowohl bei humaner DDAH-1 als auch im Gehirnhomogenat durch den Zusatz des Inhibitors L-257 unter die Nachweisgrenze gesenkt (s. Abbildung 3.11). Bei der Inkubation von Nierenhomogenat mit dem Inhibitor kam es zu einer signifikanten, vierfachen Reduktion der L-Citrullin-Bildung durch native DDAH ($(0,22 \pm 0,02) \text{ nmol min}^{-1}$ versus $(0,05 \pm 0,01) \text{ nmol min}^{-1}$ mit Inhibitor). Damit konnte deutlich gezeigt werden, dass die L-Citrullin-Bildung im Gewebe mit ADMA-Zusatz aus der DDAH-vermittelten Substratumsetzung resultierte.

3.4.2.4 Umsetzung postulierter und alternativer DDAH-Substrate

Neben den physiologischen Substraten L-NMMA und ADMA wurden auch *S*-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und *N*^ω-Amino-L-arginin als alternative Substrate für DDAH-Enzyme beschrieben (Stone *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Daher wurden mit den Cytosolen von Niere und Schilddrüse Aktivitätsstudien zur Hydrolyse der postulierten und alternativen DDAH-Substrate wie unter 3.3.3.4 beschrieben durchgeführt (s. Abbildung 3.12). Dabei repräsentierte die Schilddrüse, die nur DDAH-2 enthält, die Aktivität nativer DDAH-2 und das Nierengewebe mit hohem DDAH-1-Gehalt die Aktivität nativer DDAH-1.

3. Studien an nativer, porciner DDAH

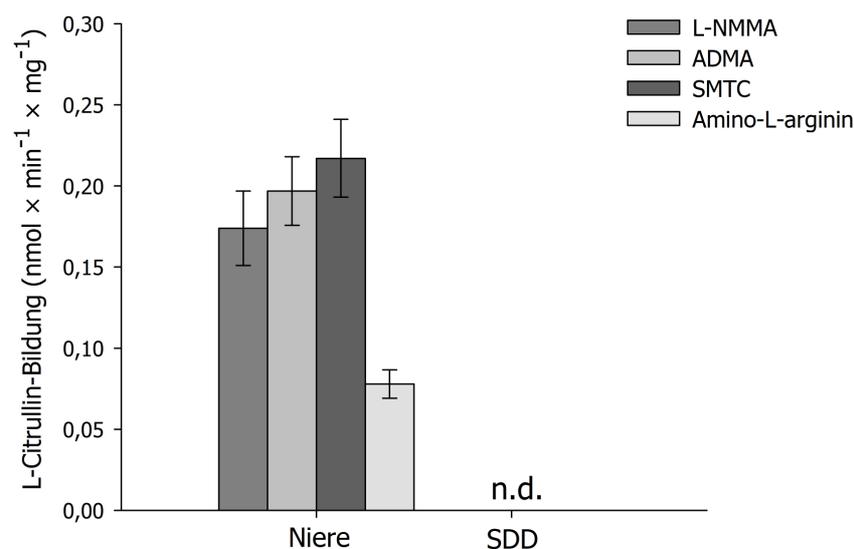


Abbildung 3.12: Substratstudie im porcinen Cytosol.

Porcine Cytosole (1,4 mg) wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 350 μ l) mit 1 mM des jeweiligen Substrats für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DDAH-Aktivität wurde als L-Citrullin-Bildung in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Gesamtprotein gemessen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus vier unabhängigen Studien, bei denen jede Probe sechsfach vermessen wurde. n.d.: Nicht detektierbar (Detektionslimit: 0,02 $\text{nmol L-Citrullin min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). SDD: Schilddrüse.

Aus der Abbildung 3.12 ist ersichtlich, dass alle Substrate von dem DDAH-1-haltigen Nierencytosol aber nicht vom DDAH-2-haltigen Schilddrüseneytosol zu L-Citrullin umgesetzt wurden. Darüber hinaus wurde ein Anstieg der Substratumsetzung von *N*^ω-Amino-L-arginin über L-NMMA und ADMA zu SMTC bei dem DDAH-1-haltigen Nierengewebe detektiert.

3.4.3 Beeinflussung der DDAH-Aktivität im porcinen Gewebe

Um zu klären, ob die L-Citrullin-Bildung in den porcinen Geweben durch einen endogenen DDAH-Inhibitor oder einen L-Citrullin-verbrauchenden Prozess beeinflusst wird, wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

3.4.3.1 Einfluss von porcinen Geweben auf die Aktivität reiner, rekombinant hergestellter hDDAH-1

Zuerst wurde die Beeinflussung der hydrolytischen Aktivität der hDDAH-1 durch porcines Gewebe ermittelt (s. Abbildung 3.13). Dazu wurden porcine Homogenate sowie rekombinant hergestellte hDDAH-1 alleine und hDDAH-1 unter Zusatz von porcinen Homogenaten mit ADMA inkubiert und die gemessene L-Citrullin-Bildung bei

Gewebezusatz um die basale DDAH-Aktivität des Gewebes korrigiert. Die resultierende hDDAH-1-Aktivität bei Gewebezusatz wurde als relative Aktivität in Bezug auf die Aktivität des reinen Enzyms (definiert als 100 %) angegeben (s. 3.3.3.5).

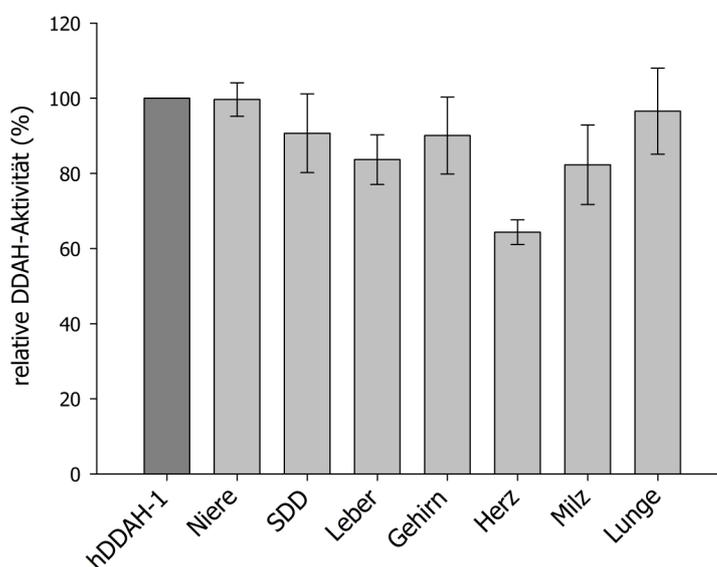


Abbildung 3.13: Einfluss von porcinen Geweben auf die hDDAH-1-katalysierte L-Citrullin-Bildung.

Rekombinant hergestellte hDDAH-1 (4 µg) wurde mit und ohne Zusatz von porcinen Homogenaten (1,2 mg) in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 345 µl) mit 300 µM ADMA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DDAH-Aktivität wurde als L-Citrullin-Bildung in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ gemessen, um die basale DDAH-Aktivität der Gewebe korrigiert und in % bezogen auf die Aktivität der reinen hDDAH-1 (definiert als 100 %) angegeben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Studien, bei denen jede Probe dreifach vermessen wurde. SDD: Schilddrüse.

Die Aktivität der hDDAH-1 wurde durch den Zusatz von Gewebe im Vergleich zur Aktivität des reinen Enzyms teilweise vermindert (s. Abbildung 3.13). Dabei lag die Restaktivität des Enzyms, abhängig vom zugesetzten Gewebe, in einem Bereich von (99,4 \pm 7,6) % im Nierenhomogenat bis (64,3 \pm 3,3) % im Herzhomogenat. Über die Ursache der reduzierten DDAH-Aktivität, die sich durch eine verminderte L-Citrullin-Bildung zeigte, gab der Versuch aber keinen Aufschluss.

3.4.3.2 L-Citrullin-Verbrauch im porcinen Gewebe

Im porcinen Gewebe gibt es zahlreiche Enzyme, die am L-Citrullin-Metabolismus beteiligt sind (Curis *et al.*, 2005). Es sollte daher untersucht werden, inwieweit der L-Citrullin-Abbau im endogenen Metabolismus der Gewebe die L-Citrullin-Detektion in

3. Studien an nativer, porciner DDAH

den Studien beeinflusst. Dazu wurden porcinen Homogenate mit 100 μM L-Citrullin ohne Substratzusatz inkubiert (s. 3.3.3.6) und die L-Citrullin-Wiederfindung der Gewebe in % in Bezug auf einen 100 μM L-Citrullin-Standard ohne Gewebezusatz (definiert als 100 %) gemessen.

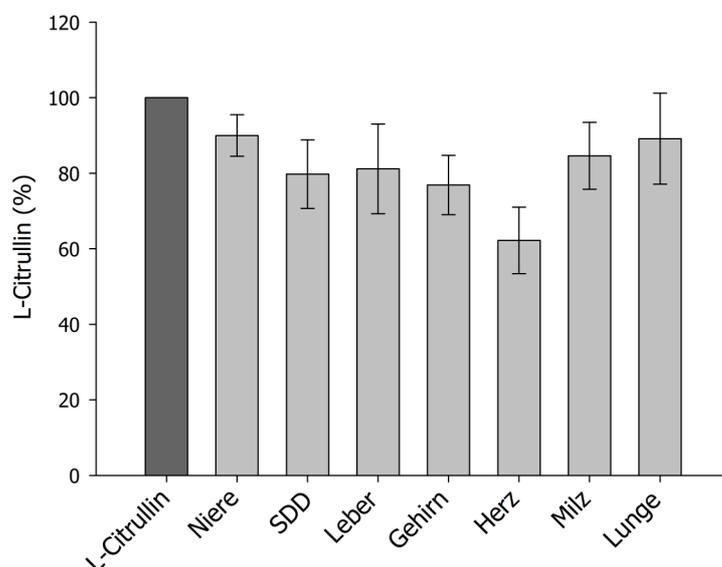


Abbildung 3.14: L-Citrullin-Verbrauch in porcinen Geweben.

Porcine Homogenate (1,2 mg) wurden ohne Substratzusatz in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4; Endvolumen 340 μl) mit 100 μM L-Citrullin für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die gemessene L-Citrullin-Wiederfindung wurde in % bezogen auf den gemessenen L-Citrullin-Wert eines 100 μM L-Citrullin-Standards (definiert als 100 %) angegeben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Studien, bei denen jede Probe dreifach vermessen wurde. SDD: Schilddrüse.

Im Vergleich zum L-Citrullin-Standard war auch die L-Citrullin-Wiederfindung in den Geweben, abhängig vom untersuchten Gewebe, von (90,0 \pm 5,5) % im Nierenhomogenat bis (62,2 \pm 8,8) % im Herzhomogenat erniedrigt (s. Abbildung 3.14).

In Abbildung 3.15 die Ergebnisse des L-Citrullin-Verbrauchs in porcinen Homogenaten und der Aktivitätsminderung rekombinant hergestellter hDDAH-1 unter dem Einfluss porciner Homogenate (s. 3.4.3.1) gegenübergestellt.

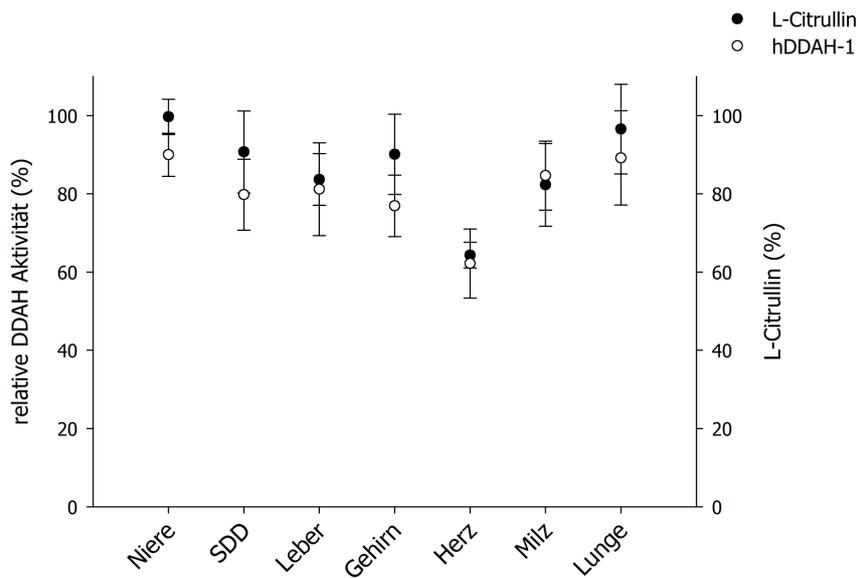


Abbildung 3.15: Gegenüberstellung des L-Citrullin-Verbrauchs in porcinen Homogenaten mit der Aktivitätsminderung rekombinant hergestellter hDDAH-1 unter Gewebezusatz.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen des zuvor ermittelten L-Citrullin-Verbrauchs in porcinen Homogenaten (schwarzer Kreis) und der relativen Aktivität rekombinanter hDDAH-1 unter dem Einfluss von porcinen Homogenaten (weißer Kreis). SDD: Schilddrüse.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem L-Citrullin-Verbrauch im Gewebe und Verminderung der hDDAH-1 Aktivität unter Gewebezusatz. Die Ergebnisse deuteten eher auf den gewebeeigenen L-Citrullin-Verbrauch als Ursache der reduzierten L-Citrullin-Detektion bei Inkubation der hDDAH-1 mit Gewebe hin.

3. Studien an nativer, porciner DDAH

3.5 Diskussion

Das grundlegende Ziel der gewebebasierten Studien war zu klären, ob die Untersuchung der Methylarginin-Umsetzung als Nachweis der DDAH-2-Enzymaktivität geeignet ist. Dazu wurden zuerst acht porcine Organe mit Western Blot-Analysen zum Vorkommen und der Gewebeverteilung der DDAH-Enzyme charakterisiert. Außerdem sollten so Gewebe identifiziert werden, die eine repräsentative Untersuchung jeder DDAH-Isoform ermöglichen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Anschluss daran die Umsetzung von postulierten und alternativen DDAH-Substraten durch die nativen DDAHs in den Geweben untersucht. Dabei wurden porcine Gewebe auf Grund ihrer hohen physiologischen Ähnlichkeit zu menschlichen Gewebe bei gleichzeitig deutlich besserer Verfügbarkeit als Humangewebe verwendet (Lunney, 2007; Rohrer *et al.*).

3.5.1 Vorkommen und Lokalisation der porcinen DDAH

Die immunologische Untersuchung der Organe wurde per Western Blot mit polyklonalen Anti-hDDAH-Antikörpern der Firma Sigma-Aldrich durchgeführt, für die eine ausreichende Spezifität zur Detektion der jeweiligen Isoform nachgewiesen worden war (s. 3.4.1.1). Mit diesen Antikörpern konnten beide DDAH-Enzyme in den porcinen Geweben detektiert werden (s. 3.4.1.2), wobei der verwendete Anti-DDAH-2-Antikörper neben der DDAH-2-Bande bei 31 kDa auch noch in einem Teil der Proben ein Protein bei 34 kDa nicht spezifisch detektierte.

Versuche, die Identität der DDAH-2-Bande in den Proben mit Peptidantikörpern von Abgent und Santa Cruz genauer zu bestimmen schlugen fehl, da beide Antikörper selbst in hohen Konzentrationen das humane Protein nur sehr schwach und die porcine DDAH-2 gar nicht detektieren. Aus diesem Grund wurden die Western Blots der Gewebe weiter mit den Antikörpern von Sigma durchgeführt.

Mit der Western Blot-Analyse der Gewebe konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals Daten zur Organverteilung der DDAH-2 im Vergleich zur DDAH-1 auf Proteinebene an acht verschiedenen Geweben erhoben werden (s. 3.4.1.2). Dabei ergaben sich zwei stark unterschiedliche organspezifische Expressionsprofile für die DDAHs mit einer Dominanz der DDAH-1 in Niere, Leber und Gehirn und der DDAH-2 in Milz,

Fett, Niere und Herz. Die Ergebnisse bestätigten die bekannten Expressionsdaten, die für die DDAH-2 bis dato hauptsächlich auf mRNA-Basis existierten, auch auf Proteinebene (Ogawa *et al.*, 1989; Bogumil *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2011). Bei der Untersuchung der porcinen Schilddrüse wurde einer der wichtigsten Entdeckungen der immunologischen Untersuchung der Gewebe gemacht. In der Schilddrüse wurde ausschließlich DDAH-2-Protein nachgewiesen, so dass erstmals ein Organ identifiziert wurde, das die Untersuchung der Aktivität nativer DDAH-2 in Abwesenheit von DDAH-1 ermöglichte.

Neben der Organverteilung wurde auch noch die subzelluläre Lokalisation der DDAHs in den präparierten Geweben untersucht (s. 3.4.1.3). Die dafür mittels Differential- und Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Präparationen stellten Anreicherungen der Subfraktionen dar (Clement *et al.*, 2005) und wurden mittels Western Blots gegen spezifische Markerproteine der Subfraktionen auf ihre Reinheit überprüft.

Birdsey *et al.*, 2000 beschrieb nach immuno-histochemischer Untersuchung von Endothelzellen eine cytosolische Lokalisation für beide DDAH-Isoformen und fand Hinweise auf eine mögliche Membranassoziation der DDAH-2. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von Chen *et al.*, 2005 an Endothelzellen, die beide DDAHs im Cytosol der Zellen, aber nicht in den ebenfalls untersuchten Mitochondrien detektierten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten in der vorliegenden Arbeit beide DDAH-Enzyme sowohl im Homogenat als auch im Cytosol nachgewiesen werden aber nicht in den Mitochondrien (s. 3.4.1.3). Für Aktivitätsstudien konnten daher sowohl die Homogenate, als auch die Cytosole verwendet werden. Die nach der postulierten cytosolischen Lokalisation der DDAHs erwartete Anreicherung im Cytosol konnte nur für DDAH-1 bestätigt werden.

Zu einer möglichen Membranassoziation der DDAHs in Mikrosomen konnte keine Aussage getroffen werden, da aus dem Blot gegen den Cytosolmarker GAPDH zu erkennen war, dass die Mikrosomenfraktion bei beiden Gewebepreparationen immer auch Cytosol und somit DDAH enthielt.

3.5.2 DDAH-Aktivität

Die DDAH-Aktivität wurde im Gewebe in Anlehnung an die Vorschrift von Tain und Baylis, 2007 zur Messung der DDAH-Aktivität im Nierengewebe von Ratten durchge-

3. Studien an nativer, porciner DDAH

führt. Da Inkubationen mit rekombinant hergestellter hDDAH-1 als Positivkontrolle die korrekte Durchführung jeder Studie belegen sollten, wurde zuerst ein möglicher Einfluss der Urease auf die Enzymaktivität der DDAH an reiner hDDAH-1 untersucht. Dabei zeigte sich keine negative Beeinflussung der hDDAH-1-Aktivität durch die Vorinkubation mit Urease (s. 3.4.2.1). Eine Testung des Urease-Einflusses auf die Aktivität rekombinant hergestellter hDDAH-2 war auf Grund fehlender hydrolytischer Aktivität des partiell gereinigten Enzyms nicht möglich (s. 2.4.1.3 und 2.4.2.3). Auf Grund der hohen Sequenzidentität von 92 % unter den Säuger-DDAH-1-Isoformen und der immerhin noch 50 %igen Sequenzidentität zwischen den DDAH-Isoformen (Frey *et al.*, 2006) wurde daher auch keine negative Beeinflussung der Aktivität porciner DDAHs durch Urease erwartet.

Die Inkubation von Homogenaten und Cytosol aller Organe mit dem DDAH-Substrat ADMA führte, nach Korrektur der Werte um die Absorption substratfreier Gewebeproben, nur in der Niere, der Leber und dem Gehirn zur L-Citrullin-Bildung als Folge von DDAH-Aktivität (s. 3.4.2.2). Die Korrelation der gemessenen DDAH-Aktivität mit dem immunologischen Nachweis der Enzyme in den Geweben zeigte dabei deutlich, dass nur Gewebe mit hohem DDAH-1 Gehalt wie z.B. die Niere das Substrat ADMA umsetzen, nicht aber stark DDAH-2 haltige Gewebe wie z.B. die Milz. Diese Ergebnisse bestätigten damit die wenigen Untersuchungen, die bis heute nur in der Niere, der Leber und dem Gehirn DDAH-Aktivität detektieren konnten und diese Aktivität der DDAH-1 zuordneten (Ogawa *et al.*, 1989; Bogumil *et al.*, 1998; Knipp, 2007). Dass in Geweben wie z.B. der Lunge mit sehr geringem DDAH-1-Gehalt keine Enzymaktivität detektiert wurde, könnte auf eine L-Citrullin-Bildung unterhalb der Nachweisgrenze zurückzuführen sein. Die fehlende Detektion enzymatischer Aktivität in stark DDAH-2-haltigen Geweben, insbesondere der DDAH-1-freien Schilddrüse, zeigte eindeutig, dass DDAH-2 kein ADMA umsetzt und verstärkte bestehende Zweifel an der für die DDAH-2 postulierten Methylarginin-Umsetzung.

In Aktivitätsstudien mit dem bekannten DDAH-Inhibitor L-257 wurde zum einen die L-Citrullin-Bildung durch hDDAH-1 in Übereinstimmung mit der Literatur (Rossiter *et al.*, 2005) unter die Nachweisgrenze gesenkt (s. 3.4.2.3). Zum anderen konnte mit der mindestens vierfachen Verminderung der gewebebasierten L-Citrullin-Bildung aus

dem DDAH-Substrat ADMA klar bewiesen werden, dass die endogene DDAH-Aktivität die Hauptursache für die L-Citrullin-Bildung im Gewebe darstellte.

Als physiologische Substrate für die DDAH-Enzyme wurden L-NMMA und ADMA postuliert (Ogawa *et al.*, 1987; Leiper *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden auch Umsetzungen von *S*-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und *N*^ω-Amino-L-Arginin als alternative Substrate für *Pseudomonas aeruginosa* DDAH (pdDDAH) (Stone *et al.*, 2005) und hDDAH-1 (Wang *et al.*, 2009) beschrieben. Eine Umsetzung dieser Substrate wurde daher auch mit den nativen DDAHs im Gewebe untersucht, wobei alle Substrate von dem DDAH-1-haltigen Nierencytosol aber nicht vom DDAH-2-haltigen Schilddrüsenzytosol zu L-Citrullin umgesetzt wurden. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass native DDAH-2 weder die postulierten noch die alternativen DDAH-Substrate umsetzt. Der Anstieg der Substratumsetzung von *N*^ω-Amino-L-arginin über L-NMMA und ADMA zu SMTC, der bereits bei der rekombinant hergestellten hDDAH-1 beobachtet wurde, ließ sich auch für die native, porcine DDAH-1 bestätigen.

Die Untersuchung einer Beeinflussung der L-Citrullin-Bildung im Gewebe sollte des Weiteren Klarheit darüber verschaffen, ob ein endogener DDAH-Inhibitor oder ein L-Citrullin verbrauchender Prozess mit der Messung der DDAH-Aktivität interferierte. Dabei konnte für rekombinant hergestellte hDDAH-1 eine Verminderung der Aktivität durch Zusatz von Homogenaten aller Gewebe gezeigt werden (s. 3.4.3.1), die sehr gut mit dem ebenfalls gemessenen L-Citrullin-Verbrauch in den Homogenaten (s. 3.4.3.2) korrelierte. Aus den Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass der L-Citrullin-Verbrauch im porcinen Gewebe z.B. durch die Arginiosuccinat-Synthase (ASS, EC 6.3.4.5) eher die gemessene L-Citrullin-Bildung beeinflusst, als ein endogener DDAH-Inhibitor. Die starke Reduktion der L-Citrullin-Wiederfindung im Herzen könnte auf hohe Spiegel der ASS im porcinen Herzen zurückzuführen sein. Die Anwesenheit eines DDAH-Inhibitors im Gewebe konnte mit den Studien zwar nicht definitiv ausgeschlossen werden, wurde aber als eher unwahrscheinlich eingestuft.

Nichtsdestotrotz konnte die DDAH-Aktivität in stark DDAH-1 haltigen Geweben problemlos detektiert werden, so dass dies grundsätzlich auch für stark DDAH-2 haltige Gewebe wie die Milz zu erwarten war. Darüber hinaus konnte bei der Untersuchung

3. Studien an nativer, porciner DDAH

der DDAH-2-Aktivität im Gewebe, im Gegensatz zur Untersuchung an rekombinant hergestelltem Enzym, sichergestellt werden, dass sämtliche potentielle Interaktionspartner und Cofaktoren vorhanden waren, dass die DDAH-2 richtig gefaltet war und eventuell nötige posttranslationale Modifikationen bis zum reifen, aktiven Protein durchlaufen hatte. Die fehlende Umsetzung der Methylarginine und der alternativen DDAH-Substrate im Gewebe war daher ein klarer Beweis für das Fehlen der postulierten hydrolytischen Aktivität für DDAH-2 im Gegensatz zur DDAH-1, obwohl die Sequenzidentität der DDAH-Enzyme 50 % beträgt und die DDAH-2 über das notwendige katalytische Zentrum für die Enzymaktivität verfügt (Frey *et al.*, 2006). Basierend auf der hohen Sequenzidentität von 95 % unter den Säuger-DDAH-2 Enzymen kann bei der fehlenden Methylarginin-Umsetzung von einer generellen Eigenschaft des Proteins ausgegangen werden (Frey *et al.*, 2006). Das bedeutet auch, dass die Untersuchung der Methylarginin-Hydrolyse entgegen einer aktuellen Publikation nicht geeignet ist, um eine DDAH-2-Aktivität zu messen und Aussagen über eine Isoformen-Selektivität von DDAH-Inhibitoren zu machen (Nandi *et al.*, 2012).

Sowohl die Ergebnisse zur Aktivität nativer porciner DDAH-2, als auch die vorherigen Untersuchungen an rekombinant exprimierter hDDAH-2 (s. 2.4.1.3 und 2.4.2.3) widersprechen klar der von Leiper und Nandi gezeigten Umsetzung von L-NMMA und ADMA durch DDAH-2 (Leiper *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2012). Sie stimmen jedoch mit den Ergebnissen anderer *in vitro* und *in vivo* Studien überein (Knipp, 2007; Wang *et al.*, 2007; Pope *et al.*, 2009b; Hu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). So detektierte Knipp, 2007 die Umsetzung von Methylargininen nur bei nativer DDAH-1 nach Reinigung beider DDAH-Enzyme aus boviner und porciner Niere und Leber. Wang *et al.* zeigten im selben Jahr mit siRNA-Studien gegen die DDAH-Enzyme an Ratten, dass ausschließlich der *knockdown* von DDAH-1 die ADMA Spiegel *in vivo* in Folge verminderter DDAH-Aktivität ansteigen lässt (Wang *et al.*, 2007). Pope *et al.* trafen, basierend auf den Ergebnissen von siRNA-Studien an bovinen Aortenendothelzellen (BAECS), die Aussage, dass die Rolle der DDAH-2 im NO-Metabolismus wohl eher ADMA-unabhängig sei (Pope *et al.*, 2009b). Auch im Arbeitskreis Clement schlugen Versuche, die von Leiper gezeigte Umsetzung mit rekombinant hergestellter hDDAH-2 zu reproduzieren, fehl (Kotthaus, 2008; Altmann, 2009). Darüber hinaus

konnten Hu *et al.* parallel zur Entstehung dieser Arbeit keine Umsetzung von stabil isotopenmarkiertem L-NMMA und ADMA im Gewebe homozygoter DDAH-1 *knockout*-Mäuse finden, obwohl keine Veränderung in den DDAH-2 Gehältern im Gewebe *der knockout*-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen detektiert wurde (Hu *et al.*, 2011). All diese Daten unterstützen die in dieser Arbeit nachgewiesene, fehlende hydrolytische Aktivität der DDAH-2 für Methylarginine. Als mögliche Ursache der fehlenden Enzymaktivität der DDAH-2 werden Unterschiede in der Struktur der Substratbinde-tasche beider DDAH-Enzyme diskutiert, die möglicherweise keine Bindung der Me-thylarginine in der DDAH-2-Struktur zulassen (Frey *et al.*, 2006; Knipp, 2007). Diese Überlegungen werden auch durch Studien mit einer DDAH-1-Mutante gestützt. Diese DDAH-1-Mutante, bei der an Position 129 das Glycin zu einem Threonin geändert wurde, um einen Teil der Substratbindetasche der DDAH-2 darzustellen, zeigte keine Methylarginin-Umsetzung (Litty).

Aus der gezeigten unterschiedlichen Organverteilung und der Substratspezifität der DDAH-Enzyme (s. 3.4.2.2) kann auf unterschiedliche Rollen der DDAH-1 und DDAH-2 im NO-Metabolismus geschlossen werden. Während DDAH-1 die methylierten Argini-ne umsetzt, stellt sich für DDAH-2 die Frage nach der tatsächlichen physiologischen Rolle, möglichen Substraten und dem Mechanismus über den das Protein nachgewie-senermaßen den NO-Stoffwechsel beeinflusst (Garbin *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007).

Aus den Ergebnissen dieser und vorheriger Arbeiten wurde die Theorie einer ADMA-unabhängigen Beeinflussung des NO-Stoffwechsels durch DDAH-2 aufgestellt. So zeigte Hasegawa *et al.*, 2006 erstmals eine direkte Protein-Protein-Interaktion der DDAH-2 mit der Proteinkinase A (PKA, EC 2.7.11.11), die nachfolgend über eine Akti-vierung des Transkriptionsfaktors Sp1 die Bildung des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) vermehrte (s. Abbildung 3.16). Interessant ist in diesem Zusammen-hang, dass VEGF seinerseits über VEGF-Rezeptoren die Phospholipase C (PLC; EC 3.1.4.11) aktiviert. Die über PLC aktivierte Signalkaskade bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und stimuliert so die NOS (Wu *et al.*, 1999). Daher ist eine Regulation der NO-Synthese über eine DDAH-2 vermittelte Modulierung der VEGF-Bildung denkbar.

3. Studien an nativer, porciner DDAH

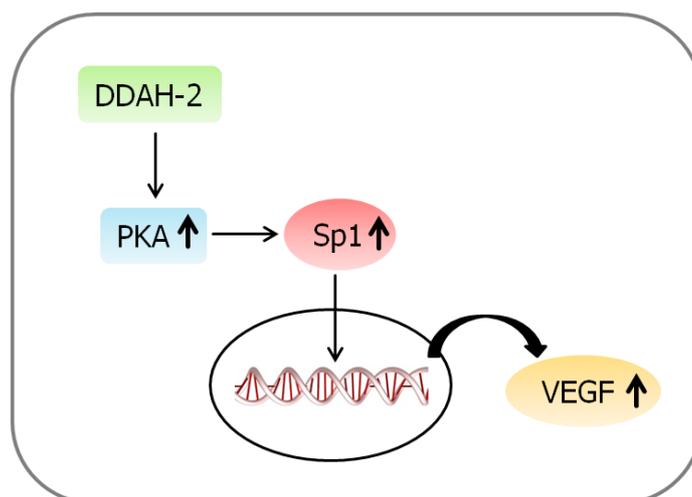


Abbildung 3.16: Postulierter Signaltransduktionsweg der Interaktion zwischen DDAH-2 und PKA mit Erhöhung der VEGF Bildung in Anlehnung an Hasegawa *et al.*, 2006.

DDAH-2: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-2; PKA: Proteinkinase A; Sp1: Transkriptionsfaktor; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

Darüber hinaus wurde in einer Veröffentlichung gezeigt, dass bei einer Überexpression von DDAH-1 in humanen Endothelzellen sowohl die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt (PKB, EC 2.7.11.1) als auch der eNOS gesteigert wird, was zur eNOS-Aktivierung und ADMA-unabhängigen Erhöhung der NO-Spiegel führt (Zhang *et al.*, 2011). Eine Phosphorylierung und Aktivierung der eNOS erfolgt auch durch die Proteinkinase A (Michell *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2004). Auf Grund der von Hasegawa entdeckten Interaktionsmöglichkeit der DDAH-2 mit der PKA ist daher eine Beeinflussung des NO-Metabolismus durch eine PKA vermittelte eNOS-Aktivierung für DDAH-2 denkbar.

Neuste Forschungsergebnisse zeigten darüber hinaus eine Protein-Protein-Interaktion zwischen DDAH-2 und Secretagogin, einem calciumbindenden Protein, das im Gehirn und in β -Zellen des Pankreas lokalisiert und am *trafficking* und der Sekretion von Vesikeln beteiligt ist (Bauer *et al.*, 2011). Auf Basis dieser Forschungsergebnisse wurde eine Beteiligung der DDAH-2 in einer Signaltransduktionskaskade identifiziert, die in β -Zellen des Pankreas die Insulinfreisetzung reguliert (s. Abbildung 3.17), und somit erste Hinweise auf eine physiologische Funktion der DDAH-2 geliefert (Hasegawa *et al.*, 2013).

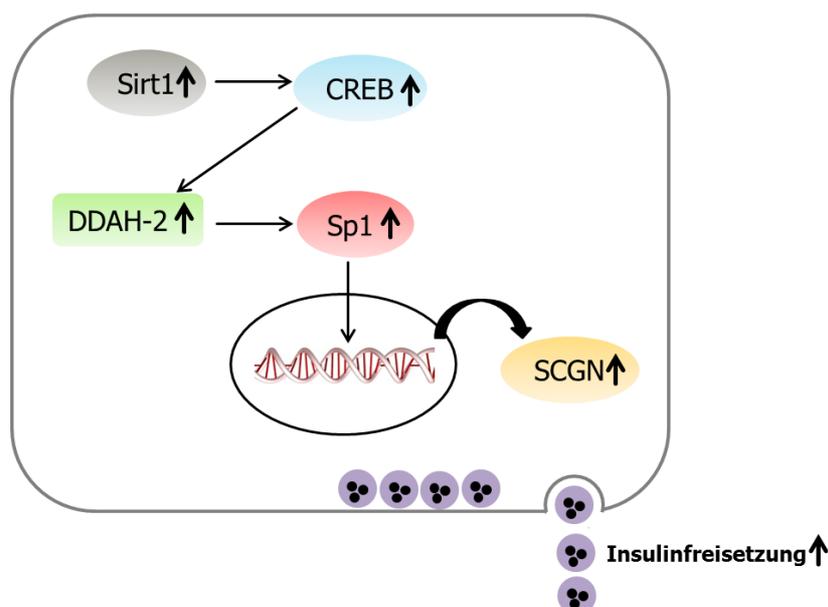


Abbildung 3.17: Postulierter Signaltransduktionsweg zur Insulinfreisetzung in β -Zellen des Pankreas in Anlehnung an Hasegawa *et al.*, 2013.

Sirt1: Sirtuin 1; CREB: *cAMP-response element binding protein*, Transkriptionsfaktor; DDAH-2: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-2; Sp1: Transkriptionsfaktor; SCGN: Secretagogen. Eine Aktivierung von Sirt1 bei Glucoseaufnahme führt über den Transkriptionsfaktor CREB zur Hochregulation der DDAH-2-Expression, welche über den Transkriptionsfaktor Sp1 im Zellkern die Expression von Secretagogen steigert. Durch die vermehrte Secretagogen-Bildung wird nachfolgend die Freisetzung von Insulinvesikeln erhöht.

Zu möglichen physiologischen Substraten der DDAH-2 gibt es dagegen derzeit keine Hinweise.

3.6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die von anderen (Rossiter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Lluís *et al.*, 2011; Linsky *et al.*, 2011) und uns (Kotthaus *et al.*, 2008) entwickelten DDAH-Inhibitoren auf ihre Isoformen-Selektivität bezüglich der DDAH-Hemmung hin untersucht werden, um sie für eine potentielle therapeutische Anwendung zu etablieren. Dabei sollte der Nachweis der Isoformenselektivität der Inhibitoren über die für die DDAHs beschriebene Umsetzung der asymmetrisch methylierten Arginine L-NMMA und ADMA zu L-Citrullin erbracht werden (Leiper *et al.*, 1999). Die in Studien mit hDDAH-2 überexprimierenden *E. coli*-Zelllysaten gezeigte Methylarginin-Umsetzung wurde jedoch kontrovers diskutiert (Knipp, 2007; Wang *et al.*, 2007; Pope *et al.*, 2009b). Da auch ein Nachweis der Enzymaktivität am reinen, rekombi-

3. Studien an nativer, porciner DDAH

nant hergestellten Enzym fehlte (siehe Kapitel 2) wurde die postulierte Umsetzung an nativer DDAH-2 im porcinen Gewebe untersucht.

Mittels Western Blot-Analysen wurden unterschiedliche Organverteilung für die DDAH-Enzyme ermittelt und die cytosolische Lokalisation der porcinen DDAH-Enzyme bestätigt. Außerdem wurden Gewebe für eine repräsentative Untersuchung der Aktivität nativer DDAHs identifiziert: Die Schilddrüse für die DDAH-2 und die Niere für die DDAH-1. Dies ermöglichte erstmals die Untersuchung der DDAH-2-Aktivität in Abwesenheit der DDAH-1.

In den Organen wurde nach Substratzugabe in Übereinstimmung mit der Literatur nur für die DDAH-1 eine Korrelation der gemessenen DDAH-Aktivität mit dem Expressionsprofil gefunden (Ogawa *et al.*, 1989, Bogumil *et al.*, 1998; Knipp, 2007). Die DDAH-2 setzte bei der Untersuchung des Schilddrüsencytosols weder die Methylarginine noch die alternativen DDAH-Substrate SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin um. Eine Umsetzung aller Verbindungen konnte dagegen durch das DDAH-1-haltige Nierencytosol nachgewiesen werden.

Aus weiteren Studien zur Beeinflussung der DDAH-Aktivität bzw. zum L-Citrullin-Verbrauch der Gewebe konnte die Anwesenheit eines DDAH-Inhibitors im Gewebe als Ursache der fehlenden DDAH-2-Aktivität als unwahrscheinlich erachtet werden. Daher bewies die fehlende Umsetzung der Methylarginine und der alternativen DDAH-Substrate in den DDAH-2 haltigen Geweben, dass DDAH-2 keine endogene hydrolytische Aktivität für L-NMMA und ADMA aufweist. Der postulierte Metabolismus ist daher nicht als Aktivitätsassay für die DDAH-2 geeignet und kann nicht zur Testung der Isoformen-Selektivität von DDAH-Inhibitoren verwendet werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Erhöhte Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) sind an der Entwicklung zahlreicher entzündlicher und neurodegenerativer Erkrankungen sowie an der Entwicklung von Diabetes, Krebs und dem septischen Schock beteiligt. Um eine überschießende NO-Bildung durch die neuronale und induzierbare NO-Synthase (NOS) zu vermeiden, ohne die Schutzwirkung der endothelialen NOS auf die Gefäße zu verlieren, ist eine selektive Hemmung der nNOS und iNOS nötig. Alle bis dato entwickelten NOS-Hemmstoffe sind jedoch auf Grund fehlender Selektivität, zu hohem Nebenwirkungspotential oder ungünstiger Pharmakokinetik nicht therapeutisch einsetzbar.

Daher rückte die indirekte Hemmung der NO-Bildung durch Blockade der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) und nachfolgender Akkumulation der endogenen NOS-Inhibitoren N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) und $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA) in den Fokus der Forschung. Die Entdeckung zweier DDAH-Isoformen und der Co-Lokalisation der DDAH-1 mit der nNOS/iNOS und der DDAH-2 mit der eNOS, führte zur Entwicklung von DDAH-Inhibitoren, um durch selektive Hemmung der DDAH-1 gezielt den NO-Stoffwechsel zu steuern.

Die Selektivität einiger wichtiger DDAH-Inhibitoren gegenüber NOS und Arginase wurde bereits erforscht. Zur Isoformen-Selektivität der DDAH-Inhibitoren konnte mangels reiner, aktiver DDAH-2 noch keine Aussagen getroffen werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die humanen DDAH-Isoformen rekombinant herzustellen und die bisher entwickelten Inhibitoren auf die selektive Hemmung einer Isoform zu untersuchen. Dazu wurde die hDDAH-1 rekombinant mit einem Histidin-*tag* (*His-tag*) in *E. coli* hergestellt und per Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni^{2+} -NTA) gereinigt.

Die rekombinante Herstellung einer aktiven, His-getaggten hDDAH-2 in *E. coli* wurde bisher nur von der Arbeitsgruppe Leiper beschrieben. Unserer eigenen Gruppe gelang zuvor nicht einmal die rekombinante Herstellung löslicher DDAH-2. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals erfolgreich die hDDAH-2 analog zur hDDAH-1 als His-getaggt, lösliches Protein in *E. coli* hergestellt werden. Bei der Etablierung einer Affinitätschromatographie für hDDAH-2 an Ni^{2+} -NTA, konnte das Protein erfolgreich angereichert werden. Im Vergleich zur hDDAH-1 waren jedoch sowohl die Bil-

4. Zusammenfassung und Ausblick

dung löslicher hDDAH-2, als auch die erreichbare Reinheit verringert. Die vollständige Entfernung von Wirtsproteinen war, wie im Fall der DDAH-1-Reinigung, nicht möglich.

Aussagen zur *in vitro* Aktivität der DDAH sollten entsprechend der Publikationen von Ogawa *et al.*, 1987 und Leiper *et al.*, 1999 über die Hydrolyse von Methylargininen zu L-Citrullin getroffen werden können. Daher wurden die beiden rekombinant hergestellten hDDAH-Enzyme mit dem Substrat ADMA inkubiert und die L-Citrullin-Bildung per HPLC mit Fluoreszenzdetektion untersucht. Im Gegensatz zur hDDAH-1, die das Substrat fast vollständig zu L-Citrullin hydrolysierte, konnte bei hDDAH-2 unter verschiedenen Bedingungen keine ADMA-Umsetzung nachgewiesen werden. Da die hergestellte hDDAH-2 keine Aktivität aufwies, konnten auch keine Selektivitäts-Untersuchungen der DDAH-Inhibitoren erfolgen.

Um zu klären, ob die fehlende hydrolytische Aktivität der hDDAH-2 in Defiziten auf Grund der Herstellung in *E. coli* begründet liegt, oder eine Hemmung durch andere Proteine aus den Eluaten erfolgt, wurden verschiedene Lösungsansätze verfolgt. Dabei zielten die ersten Ansätze darauf ab, die Reinigung zu verbessern, um reinere DDAH-2 auf ihre Aktivität testen zu können. Zusätzlich sollte der lösliche Anteil der hDDAH-2 erhöht werden, damit bei der Reinigung die Konkurrenz mit Wirtsproteinen an der Matrix und so der Verunreinigungsgrad reduziert wird.

Die Verwendung eines anderen *E. coli*-Stamms steigerte die Bildung löslicher His-*tag* hDDAH-2 nicht. Die Herstellung einer löslichen hDDAH-2 mit größerem Abstand zwischen His-*tag* und Protein, ähnlich der hDDAH-2 von Leiper *et al.*, war erstmals möglich. Der größere Abstand verbesserte jedoch die Zugänglichkeit des *tags* durch die Matrix und somit auch die Reinigung nicht. Darüber hinaus brachte auch die Modifikation der hDDAH-2-Struktur mit beidseitigen His-*tags* oder His-GST-Doppel-*tags* keinen Durchbruch bei den Problemen der Proteinreinigung.

In der Literatur fanden sich viele Hinweise, dass die Löslichkeit und Aktivität von Proteinen bei rekombinanter Überproduktion in Mikroorganismen durch Überlastung der zellulären Faltungsmechanismen verringert ist. Ebenso war bekannt, dass die Herstellung von Fremdproteinen zusammen mit Faltungshelfern wie den *E. coli*-eigenen

Chaperonen DnaK und GroEL sowie dem dazugehörigen Cochaperon Limitationen in der Faltung und Löslichkeit verbessern.

Die Fusion der hDDAH-2 mit DnaK bzw. GroEL und die Herstellung mit dem passenden Cochaperon verbesserte die Ausbeute löslichen Proteins nicht, so dass ein Faltungsproblem als Ursache der geringen DDAH-2-Löslichkeit unwahrscheinlich war. Allerdings brachte die Fusion mit GroEL den Durchbruch bei der Reinigung, so dass erstmals rekombinante hDDAH-2 mit einem, der hDDAH-1 vergleichbaren Reinheitsgrad, gewonnen werden konnte. Aber auch diese rekombinante hDDAH-2 setzte im Vergleich zur His-getaggten hDDAH-1 weder L-NMMA, ADMA, noch die alternativen DDAH-Substrate S-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und N^{ω} -Amino-L-arginin um.

So ergaben sich, zusammen mit dem fehlenden ADMA-Abbau durch His-getaggte hDDAH-2, Zweifel an der von Leiper *et al.*, 1999 postulierten, endogenen Fähigkeit der DDAH-2 zur Hydrolyse der Methylarginine. Ein definitives Urteil ließen die Aktivitätsstudien mit GroEL-hDDAH-2 jedoch nicht zu, da ein Einfluss des großen GroEL-Restes auf die DDAH-Struktur und Aktivität nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine Abspaltung des GroEL für erneute Aktivitätsstudien mit höherer Aussagekraft konnte trotz vielfältiger Bemühungen nicht erreicht werden.

In weiteren Versuchen wurde die hDDAH-2 nach einer Vorschrift von Waldo *et al.*, 1999 mit einem C-terminalem GFP als Fluoreszenz-Reporter der DDAH-2-Faltung in *E. coli* hergestellt. Damit sollte für hDDAH-2 per Fluoreszenzanalyse das Erreichen einer nativen Struktur als strukturelle Grundvoraussetzung für DDAH-Aktivität bei Herstellung in *E. coli* geprüft werden. Die Herstellung löslicher hDDAH-2-GFP wurde von der parallelen, bevorzugten Bildung von GFP soweit unterdrückt, dass eine Reinigung ausreichender Mengen zur Fluoreszenzanalyse der hDDAH-2-Faltung nicht möglich war.

Durch Mutationen im GFP wurde zwar die unabhängige Bildung von GFP unterdrückt, die Bildung von hDDAH-2-GFP war aber immer noch zu gering für Reinigung und Studien. Es war daher nicht möglich, strukturelle Probleme bei der Herstellung der DDAH-2 in *E. coli* als Ursache der fehlenden Enzymaktivität auszuschließen.

Versuche die humane DDAH-2 als GFP-Fusionsprotein im Eukaryoten *Dictyostelium discoideum* herzustellen, führten auch nicht zur Proteinbildung. Deshalb bestand

4. Zusammenfassung und Ausblick

nicht die Möglichkeit die Auswirkungen Säuger-ähnlicherer Bedingungen bezüglich der Faltung, Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation und potentieller Interaktionspartner auf die Herstellung und Aktivität der DDAH-2 zu testen.

Um die von Leiper *et al.*, 1999 postulierte Methylarginin-Umsetzung durch DDAH-2 prüfen zu können, wurde unsere Variante der hDDAH-2, ohne Abstand zwischen Protein und His-*tag*, und die hDDAH-2-Variante aus der Publikation von Leiper untersucht. Beide Varianten wurden entsprechend der Publikation in *E. coli* hergestellt. Im Gegensatz zur hDDAH-1 konnte aber bei keiner der hDDAH-2-Proteine im Lysat und Überstand eine Umsetzung von L-NMMA, ADMA, SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin zu L-Citrullin nachgewiesen werden. Somit konnten wir, ebenso wie die Arbeitsgruppen von Knipp und Fast, eine Hydrolyse methylierter Arginine für rekombinant hergestellte DDAH-2-Enzyme nicht nachweisen. Auch die aktuell in der Veröffentlichung von Nandi *et al.*, 2012 erwähnte Reinigung der DDAH-2-Variante von Leiper gelang in eigenen Versuchen nicht. Darüber hinaus konnte Knipp für nativ gereinigte DDAH-2 im Vergleich zur DDAH-1 keine Hydrolyse von L-NMMA und ADMA nachweisen. Es wurde daher angezweifelt, dass die Umsetzung von Methylargininen als Nachweis der hydrolytischen Aktivität der DDAH-2 für Studien zur Selektivität von DDAH-Inhibitoren überhaupt geeignet ist.

Aus diesem Grund wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die nativen DDAH-Enzyme im porcinen Gewebe auf hydrolytische Aktivität untersucht. Im Gegensatz zur Untersuchung an rekombinant hergestellter DDAH-2 bot dieses Vorgehen zwei entscheidende Vorteile: Erstens befanden sich die Proteine weitestgehend in ihrer physiologischen Umgebung mit allen potentiellen Cofaktoren und Interaktionspartnern; zweitens war die korrekte Faltung und eventuell nötige posttranslationale Modifikationen der Proteine gegeben.

Zuerst wurde per Western Blot ein organspezifisches Expressionsprofil für die porcinen DDAH-Enzyme in acht verschiedenen Geweben ermittelt. Die hauptsächliche Lokalisation der DDAH-1 in Niere, Leber und Gehirn wurde bestätigt und die Lokalisation der DDAH-2 mit klarer Dominanz in Milz, Fett, Niere und Herz erstmals auch auf Proteinebene nachgewiesen. Außerdem konnten die Daten zur subzellulären Lokalisation der Enzyme bestätigt werden. Darüber hinaus wurde in der Schilddrüse nur die

Bildung nativer DDAH-2 nachgewiesen. Dadurch wurde es erstmals möglich, die Aktivität nativer DDAH-2 im Gewebe in Abwesenheit der DDAH-1 zu untersuchen. Im Gegensatz dazu war die Niere mit dem höchsten DDAH-1-Gehalt repräsentativ für die DDAH-1-Aktivität.

Bei der Inkubation der Gewebe mit dem DDAH-Substrat ADMA wurde die Bildung von L-Citrullin, in Übereinstimmung mit der Literatur, nur in stark DDAH-1-haltigen, nicht aber in stark DDAH-2-haltigen Geweben nachgewiesen. Analysen mit dem DDAH-Inhibitor L-257 an Niere, Gehirn und reiner, rekombinant hergestellter hDDAH-1 verifizierten die DDAH-1 als Quelle der gemessenen L-Citrullin-Bildung.

In weiteren Studien setzte das DDAH-2-haltige Schilddrüsencytosol weder L-NMMA und ADMA noch die alternativen DDAH-Substrate SMTC und N^{ω} -Amino-L-arginin um. Eine Umsetzung aller Verbindungen konnte dagegen durch das DDAH-1-haltige Nierencytosol nachgewiesen werden. Die Anwesenheit eines endogenen DDAH-Inhibitors wurde als Ursache der fehlenden DDAH-2-Aktivität als sehr unwahrscheinlich erachtet. Einerseits, da für DDAH-1 durchaus Aktivitäten gemessen werden konnten und andererseits, da die Reduktion der Aktivität rekombinanter hDDAH-1 durch porcine Gewebe mit dem ebenfalls gemessenen L-Citrullin-Verbrauch der Gewebe korrelierte.

Die Ergebnisse zur Umsetzung der Methylarginine und der alternativen DDAH-Substrate durch native DDAH-Enzyme bestätigten daher die Daten aus den Versuchen mit der rekombinant hergestellten DDAH-2 und die Aktivitätsuntersuchungen von Knipp. Obwohl die DDAH-2 eine 50 %ige Sequenzidentität zur DDAH-1 und das notwendige katalytische Zentrum für die Enzymaktivität besitzt, hat sie keine endogene hydrolytische Aktivität für L-NMMA und ADMA. Demzufolge ist der postulierte Metabolismus weder als Aktivitätsassay für die DDAH-2, noch zur Testung der Isoformen-Selektivität von DDAH-Inhibitoren geeignet.

Die Herstellung der hDDAH-2 wurde in dieser Arbeit auf sehr vielfältige Weise in *E. coli* und in *Dictyostelium discoideum* durchgeführt, wobei keiner der Wege zu aktivem Protein führte. Hinzu kommt, dass weder die rekombinante noch die native DDAH-Isoform 2 die angegebene intrinsische Enzymaktivität zur Hydrolyse methylierten Arginine und anderer Substrate aufweist. Da die DDAH-2 aber nachweislich eine Funktion im NO-Stoffwechsel ausübt und auch Effekte im Organismus

4. Zusammenfassung und Ausblick

durch direkte Protein-Proteininteraktionen beschrieben wurden, ist es die wichtigste Aufgabe, die physiologische Funktion dieses Proteins aufzuklären. Dafür könnte die Aufklärung der Kristallstruktur des Enzyms einen maßgeblichen Beitrag leisten. Auf Grund der vielfältigen, gescheiterten Versuche die DDAH-2 in Mikroorganismen, Insekten- und Säugerzellkulturen in ausreichender Menge und Reinheit zu produzieren, ist ein rekombinanter Ansatz für die Erstellung der Kristallstruktur nicht empfehlenswert. Sinnvoller ist es, trotz des höheren Aufwands, das native Protein mit konventionellen Methoden zu reinigen und seine Struktur aufzuklären. Erst dann kann geklärt werden, ob die im Homologiemodell von Knipp, 2007 vorhergesagten Unterschiede in der Substratbindetasche der DDAH-2 ursächlich für die Unterschiede im Reaktionsverhalten der DDAH-Isoformen sind. Auf diese Weise könnten auch Eigenschaften für potentielle endogene Substrate abgeleitet werden und gezielter nach physiologischen Substraten der DDAH-2 gesucht werden. Möglicherweise lassen sich so auch andere Bereiche im Protein identifizieren, die seine physiologische Funktion erklären.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist es sehr gut möglich, dass DDAH-2 seine physiologische Rolle und die Effekte auf den NO-Stoffwechsel über direkte Protein-Proteininteraktionen vermittelt. Daher sollten die Beteiligung der DDAH-2 in weiteren Signaltransduktionswegen und Interaktionen mit anderen Proteinen weiter analysiert werden. Die üblicherweise zur Suche nach Interaktionspartnern genutzten *pull-down-studies* mit rekombinanten GST-gekoppelten Proteinen, sind auf Grund der zuvor beschriebenen Probleme bei der rekombinanten Herstellung der DDAH-2 weniger geeignet. Interessanter ist die Analyse der DDAH-2 in Zellen. Dabei würden sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit Untersuchungen in der Milz oder in Schilddrüsenzellen anbieten. Um allgemein potentielle Interaktionspartner zu suchen, könnte die Interaktion von DDAH-2 mit verschiedenen Proteinen auf sogenannten Protein-*arrays* untersucht werden. Auf diese Weise wurde die DDAH-2 als Interaktionspartner von Secretagogin gefunden. Die potentiellen Interaktionspartner aus diesen Analysen können dann zum einen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie verifiziert werden oder, analog zu den Arbeiten zur DDAH-1, die Effekte auf die Zielproteine in Zellen mit siRNA gegen DDAH-2 ermittelt werden.

5. Material und Geräte

5.1 Enzyme, Kits und Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, stammen die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, Medien und Antikörper von den Firmen Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) und Merck KGaA (Darmstadt). Alle Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen.

Abcam plc, Cambridge (UK):

Anti-GAPDH Antikörper

Acris Antibodies GmbH, Herford:

Anti-Calnexin Antikörper, Anti-VDAC-2 Antikörper

AGFA Healthcare, Mortsel (Belgien):

Rapid Fixer (G354) und Developer (G153) for medical x-ray film processing

Biochrom AG, Berlin:

Penicillin, Streptomycin

Bio Rad, München:

Protein Assay-Reagenz

Cayman Chemicals, Ann Arbor (USA):

SMTC-hydrochlorid, *N*^ω-amino-L-arginin-hydrochlorid

Enzo Life Science GmbH (Alexis Biochemicals), Lörrach:

L-NMMA-monoacetat, ADMA-dihydrochlorid

Fermentas, St. Leon-Rot:

Restriktionsendonukleasen, Reaktionspuffer zu den Enzymen, T4 DNA-Polymerase (5U/μl), T4 DNA-Ligase (5U/μl), λ-DNA, *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*

ForMedium™, Hunstanton (UK):

HL5-Medium

GE Healthcare (Amersham Biosciences), Little Chalfont (UK):

ECL Plus Western Blotting Detection System, Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit

5. Material und Geräte

Genaxxon Bioscience, Biberach:

GenAgarose LE, dNTPs

Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk (UK):

Goat Anti-Mouse IgG-HRP, Donkey Anti-Goat IgG-HRP

J.T. Baker, Denver (Holland):

Methanol, Eisessig

Life Technologies GmbH, Darmstadt:

Mark12™ *Unstained Standard*

Macherey-Nagel, Düren:

Nucleo Bond® PC 500 Kit

Merck KGaA, Darmstadt:

Benzonase® Nuclease (25U/μl)

MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich):

Ethidiumbromidtabletten

MWG Biotech AG, Ebersberg:

T7- und T3-Sequenzierprimer

National Diagnostics, Atlanta (USA):

SequaGel® XR 7,5 %, SequaGel® Complete Buffer Reagent

New England Biolabs, Frankfurt:

One *Taq*®-DNA-Polymerase (5U/μl), Reaktionspuffer für One *Taq*®-Polymerase

PeqLab, Erlangen:

peqGOLD Protein-Marker I, peqGOLD prestained Protein-Marker III

Pierce, Rockford (USA):

Pierce® BCA Protein Assay Kit, Pierce® Compat-able Protein Assay Kit, Pierce® Centrifuge Columns (2ml), Albumin Standard (2 mg/ml)

Promega, Madison (USA):

Wizard® Plus SV-Minipreps DNA Purification System, Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP

Qiagen, Hilden:

Ni²⁺-NTA Agarose, RGS-His Antikörper (BSA frei), Penta-His Antikörper

Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas (USA):

Anti-GFP (FL) Antikörper

Serva, Feinbiochemika, Heidelberg:

Bromphenolblau

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

Bovines Thrombin lyophilisiert (40-300 U/mg Pulver)

Stratagene, La Jolla (USA):

PfuTurbo[®]-DNA-Polymerase AD (2,5 U/μl)

Süd-Laborbedarf GmbH, Gautingen:

Hi Yield[®] PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit

5.2 Geräte und Materialien

Adolf Wolf SANOClav, Bad Überkingen-Hausen:

Sanoclav Sterilisationsautoklav 3 Bar

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen:

Tischzentrifuge Hettich Mikro 200

Bandelin, Berlin:

Ultraschallbad SONOREX RK 514

Beckman Coulter, Palo Alto (USA):

Optima[™] XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti; Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti; Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA10; Polycarbonat Ultrazentrifugen Röhrrchen (26 ml), Polyallomer Mikrozentrifugen Röhrrchen (1.5 ml), DNA-Sequenzierer *CEQ 8000 Genetic Analysis System*

Bio Rad Laboratories, München:

SDS-PAGE *Mini Protean*[®] Tetra Cell System, Blot-System *Mini-Trans-Blot*[®] Cell, *Gene Pulser*[®] II Electroporation System

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim:

UV-Einmalküvetten mikro, Zentrumshöhe 15 mm (70-550 μl)

B. Braun Melsungen AG:

Omnifix[®]-F Feindosierungsspritzen (1 ml), Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill

Canon Inc., Tokio (Japan):

Scanner Canon LiDE 110 mit CanoScan LiDE 110 Software

Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen:

Cawomat 2000 IR, ABS-Kassette

5. Material und Geräte

Clemens, Waldbüttelbrunn:

Primus *advanced* HT2X Dualblock PCR System mit HT *Manager Software*

Eigenbau der Universität Austin, Texas (USA):

Messer-Homogenisator

Edmund Bühler, Hechingen:

Bühler Schüttler KL2

Eppendorf, Hamburg:

Thermostat 3401, BioPhotometer, Kühlzentrifuge 5415 R, Pipetten Reference[®], Multipette Plus, Mehrkanalpipette *Research Pro*, Combitips Pro

GE Healthcare (Amersham Biosciences), Little Chalfont (UK):

HybondTM-P PVDF-Blottingmembran (0,2 µm Porenweite), *Hyperfilm-ECL*, *ÄKTATM* Purifier mit *UnicornTM-Software* 5.11

GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel:

Wasserbad GFL[®] 1083

Greiner bio-one, Frickenhausen:

96-well Mikroplatten (nicht hitzestabil) und *falcon tubes* (15, 50 ml)

Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen:

Fine-ject Einmalkanülen 23G

Hellma, Müllheim:

Quartzküvette 105.202-QS

Heraeus Instruments, Osterode:

Multifuge 1S-R Zentrifuge (Rotoren 75002006/75002000), Kelvitron[®] T Typ B6420, Biofuge pico, Benches HERA *Guard* und Hera *Safe* Type HS 12, Trockenschrank T6060

Herolab, Wiesloch:

UV-Transilluminator UVT-20 S/M, *Raytest IDA Image Documentation and Analysis*

H+P Labortechnik, Oberschleißheim:

Variomag Mono Direct Magnetrührer

Infors, Bottmingen (Schweiz):

Ecotron und Minitron (Brutschrank mit integriertem Schüttler)

Jupiter Kitchen Tools GmbH, Schorndorf:

Jupiter Fleischwolf Typ 885

Kern & Sohn, Balingen-Frommern:

ABS 120-4 (Analysenwaage)

LI-COR Biosciences, Bad Homburg:

LI-COR™ *DNA Sequencer* 4200

LTF Labortechnik, Wasserburg:

Platten-Schüttelinkubator DTS-4

Merck KGaA, Darmstadt:

Amicon® *Ultra Centrifugal Filter Units* 10 kDa (0,5 und 4 ml)

Metrohm, Zofingen (Schweiz):

pH-Meter 605

Mettler-Toledo, Gießen:

Rainin Classic, PB3002-S Delta Range Waage

Molecular Devices LLC, Sunnyvale (USA):

ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System mit *MetaXpress*

Software 5.1.0.41

MWG-Biotech, Ebersberg:

BaseImagIR V.4.2

Nalgene Nunc, Penfield (USA):

96-well Mikrotiterplatten (hitzestabil)

Olympus, Hamburg:

Inverses Systemmikroskop IX70, CK2/ULWCD 0.30 Mikroskop

PerkinElmer, Waltham (USA):

Fluorimeter LS 55, *OptiPlate*™-96

Pharmacia Biotech, Freiburg

Elektrophoresis Power Supply-EPS-300

Roche, Mannheim:

Bild-Dokumentationssystem Lumi Imager™F1

Roth, Karlsruhe:

Zellu Trans Dialysierschlauch 6,0

Sarstedt, Nümbrecht:

Labor-Verbrauchsmaterialien jeglicher Art (z.B. Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml, Pipettenspitzen, Sterilfilter), auch für die Zellkultur

5. Material und Geräte

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen:

Waage MC1 *Research* RC210 P

Savant Instruments, Farmingdale (USA):

Vakuumpzentrifuge *DNA SpeedVac*[®] DNA 110

Schleicher & Schuell, Dassel:

Whatman Chromatography Papier 3MM

SCHOTT Instruments, Mainz:

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850-Set, *BlueLine* 16-pH Mikro-Elektrode, *BlueLine* 12 pH-Elektrode

Scientific Industries, New York (USA):

Vortex-Genie 2

SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Barsbüttel:

Reinstwasseranlage SG *Ultraclear* 2003

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

HIS-Select[®] *High Flow Cartridge* (1,25 ml)

Superior, Marienfeld:

Zählkammer Fuchs-Rosenthal *Bright Line*

Thermodux, Wertheim:

Techne *DRI-Block*[®] DB-2D

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA):

French Press Cell Disrupter (FA078) mit French Press Zelle FA-032, hitzeresistente Abdeckfolie

Varian GmbH, München:

UV/Vis-Spektrophotometer Varian Cary 50 UV-Vis mit Microplatten-Reader 50MPR, *Cary Win UV Software* Version 2.0

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim:

pH-Messgerät inoLab[®] pH level 1

WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen:

Heißluftsterilisator

Zirbus, Bad Grund:

Autoklav LTA 32/25

5.3 DNA-Sequenzen

Name	Beschreibung	Gene ID	Quelle
hDDAH-1	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-1, Hydrolase aus <i>homo sapiens</i>	23576	NCBI
hDDAH-2	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-2, Hydrolase aus <i>homo sapiens</i>	23564	NCBI

5.4 Oligonucleotide (Primer)

5.4.1 Sequenzierprimer

Die Sequenzierungsprimer für das Plasmid pBluescript II SK (-) sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert.

Name	Sinn	Sequenz	Plasmid/ Sequenz
T₇-Primer	s	TAATACGACTCACTATAGG	pBluescript II SK (-) pIVEX2.3wGFPc
T₃-Eurofins	as	AATTAACCCTCACTAAAGGG	pBluescript II SK (-)
Seq.-reverse	as	AAATCGTTTGAATCTTACAAGCTGGTC	pIVEX2.3wGFPc
Seq.-GST	s	TTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATG	pETM-33
T₇-term.	as	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pETM-33
fwpDXA-GFP2	s	TTCAGATTGCATAAAAAGATT	pDXA-GFP2
HindIII/KpnI			
SequD2pDXA	s	GCAGTGCTGACAGATCACCCATAT	hDDAH-2
GFP2_F			
rpDXA-GFP2	as	ACCTTCACCCTCTCCACTGACAGA	pDXA-GFP2
HindIII/KpnI			
fwSequ_pPro	s	AGCGGATAACAATTTACACAGG	pProEX-Hta
Ex-Hta			
rSequ_pBADrv	as	ATCTGTATCAGGCTGAAAATC	pProEX-Hta

5. Material und Geräte

5.4.2 Klonierungsprimer

Die Schnittstelle ist fett gedruckt. Mit Ausnahme des rDictyDDAH-2-Primers tragen alle Primer vor der Schnittstelle die Schutzbasensequenz "GAGAGA".

Name	Sinn	Sequenz	Schnitt- stelle	Nummer
fwDDAH-2 (pXCK-K)	s	GGATCCA ATGGGGACCCGGGGG AGGGGCTG	BamHI	(1)
rDDAH-2 (pXCK-K)	as	AAGCTT GCTGTGGGGCGTGTGC TGAG	HindIII	(2)
fwDDAH-2 NcoI	s	CCATGGG GACCCGGGGGAG	NcoI	(3)
rDDAH-2 SmaI	as	CCCGGG GCTGTGGGGG CGTGTGCT	SmaI	(4)
fwGFPDDAH-1	s	TCTAGA TTGTTAACTTTAAGAAG GAGATATACATGGCCGGGCTCGGC CAC	XbaI	(5)
rGFPDDAH-1	as	GGATCC GGAGTCTACTTTCTTGTTAA TTAAAACTGAGCA	BamHI	(6)
fwGFPDDAH-2	s	TCTAGA TTGTTAACTTTAAGAAGG AGATATACATGGGGACCCGGGGGAG	XbaI	(7)
rGSTDDAH-2	as	CTCGAG GCTGTGGGGCGTGTGCT	XhoI	(8)
fwDictyDDAH-2	s	AAGCTT ATGCATCACCATCACCATCA CGGATCCATGGGGACG	HindIII	(9)
rDictyDDAH-2	as	AGAGAG GGTACC GCTGTGGGGGCG TGTGCTGAG	KpnI	(10)
fwDDAH-2 EcoRI	s	GAATTC ATGGGGACCCGGGGGAG	EcoRI	(11)
rDDAH-2 XbaI	as	TCTAGA TAGCTGTGGGGCGTGTG CTGAG	XbaI	(12)

5.4.3 Mutageneseprimer

Die mutierten Coden sind fett gedruckt.

Name	Sinn	Sequenz	Nummer
pIVEXGFP	s	GATTTGAAGCAAAAAGGTT Aaca ACCAC g TGAG	(13)
MNMVs		TAAAGGAGAAGAAC	
pIVEXGFP	as	GTTCTTCTCCTTTACT CAc GTGGTT gt TAACC	(14)
MNMVs		TTTTGCTTCAAATC	

5.5 Plasmide

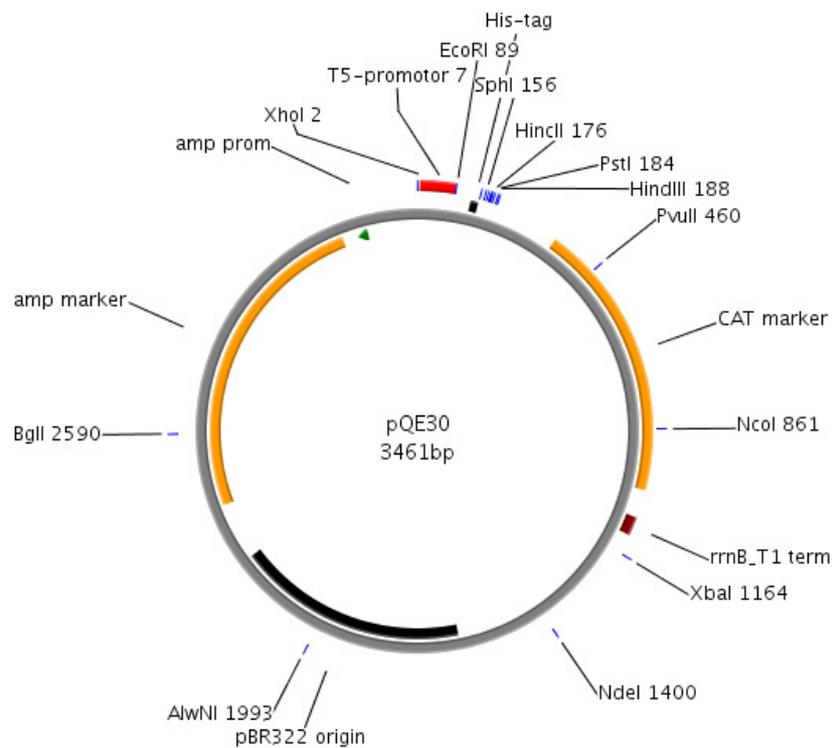


Abbildung 5.1: pQE30

5. Material und Geräte

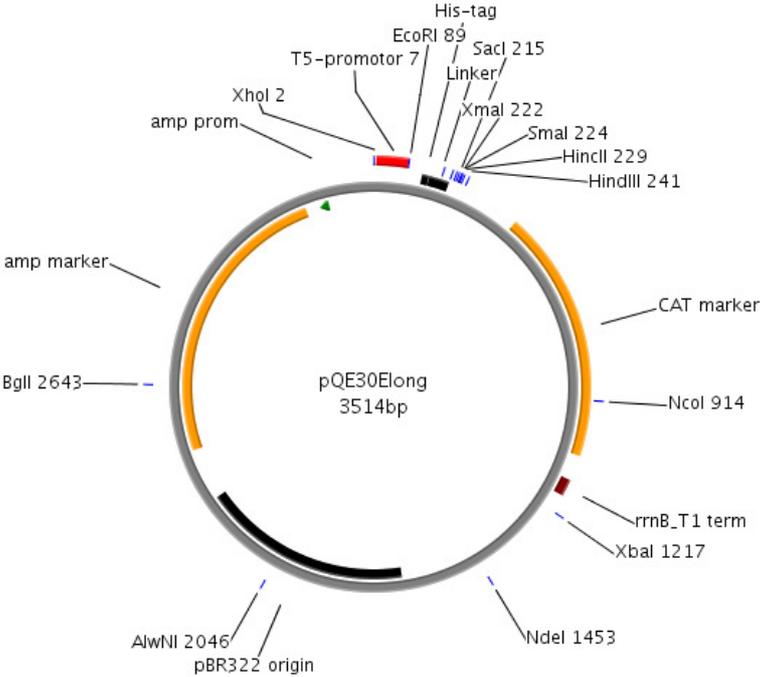


Abbildung 5.2: pQE30Elong

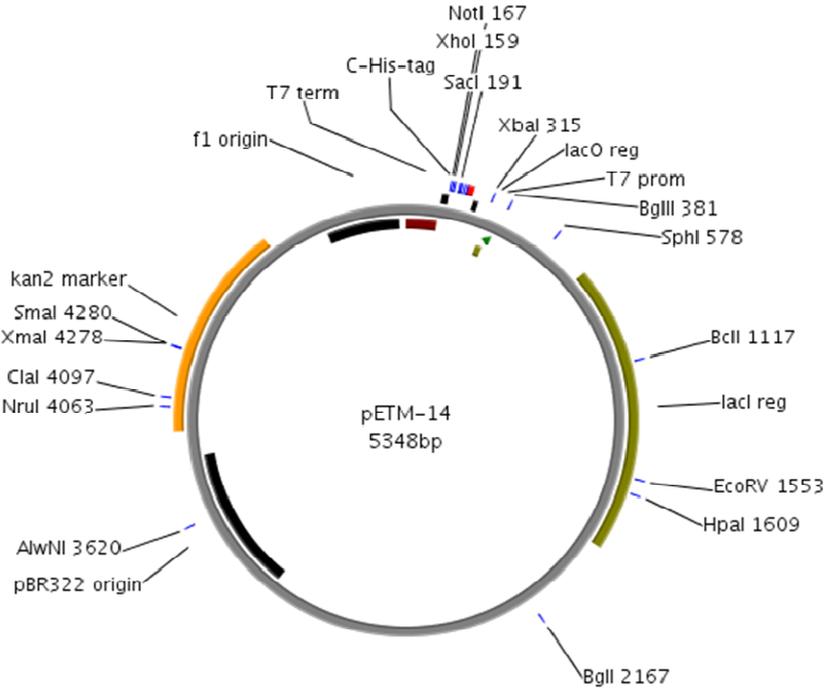


Abbildung 5.3: pETM-14

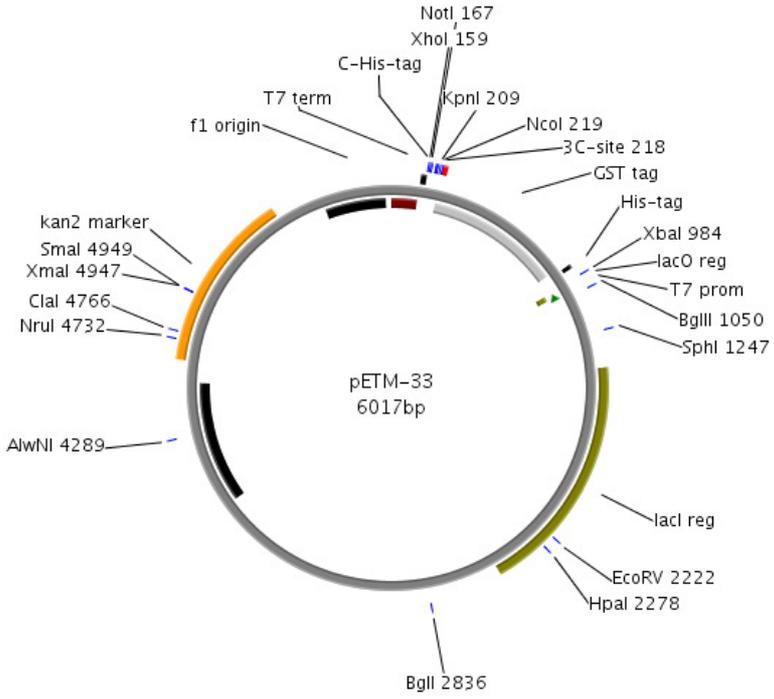


Abbildung 5.4: pETM-33

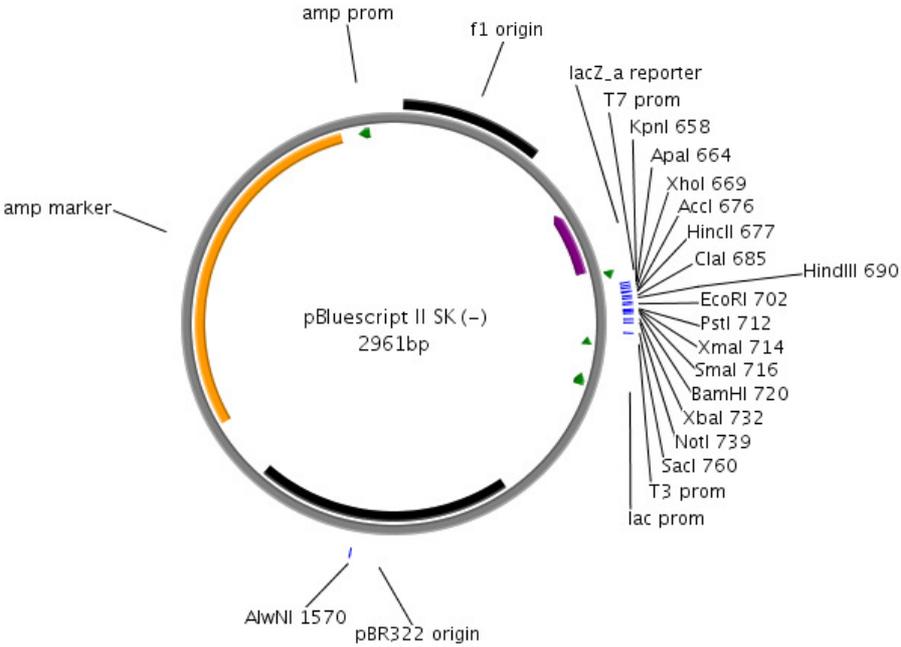


Abbildung 5.5: pBluescript II SK (-)

5. Material und Geräte

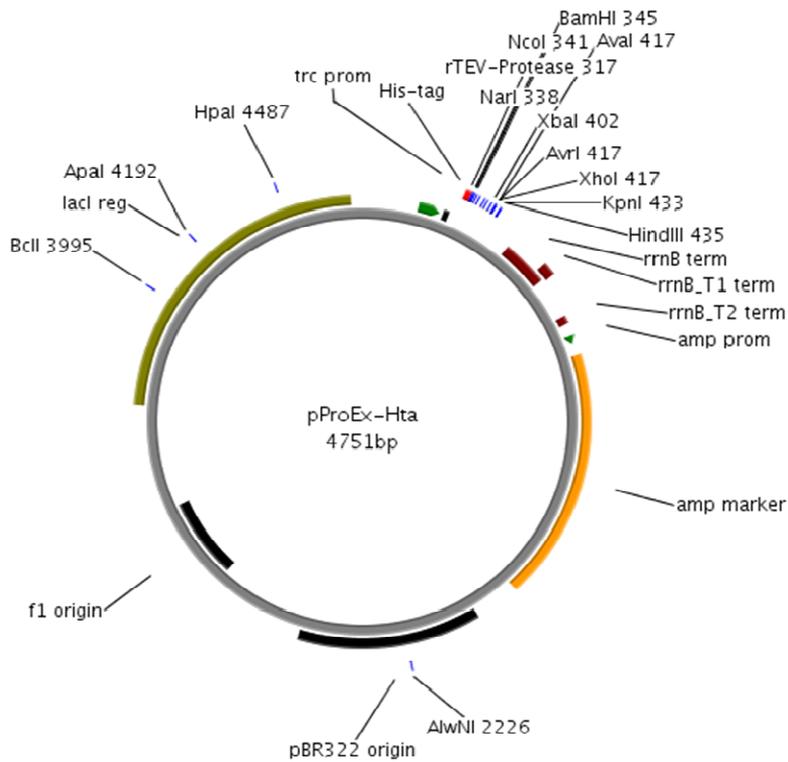


Abbildung 5.6: pProEx-Hta

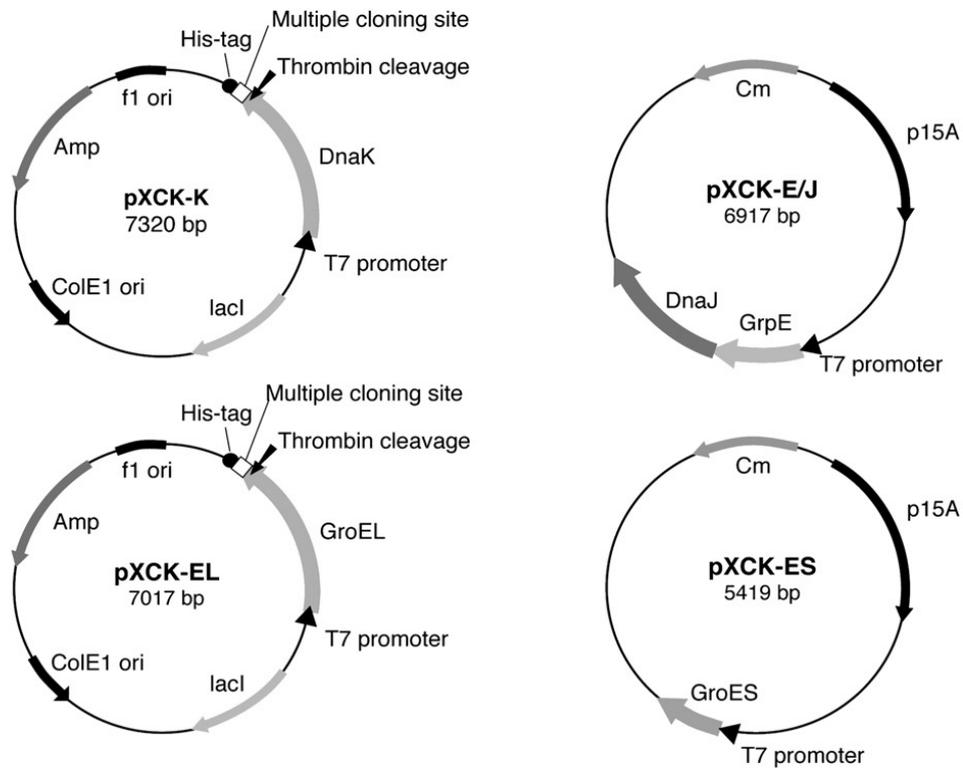


Abbildung 5.7: pXCK-K mit Coplasmid pXCK-E/J und pXCK-EL mit Coplasmid pXCK-ES. Abbildung aus Kyrastous *et al.*, 2009.

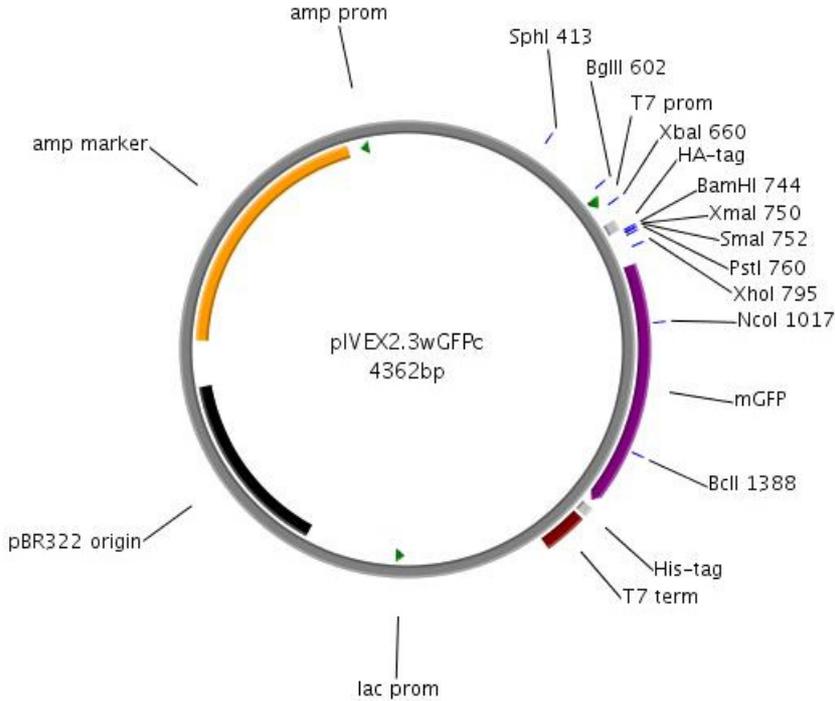


Abbildung 5.8: pIVEX2.3wGFPc

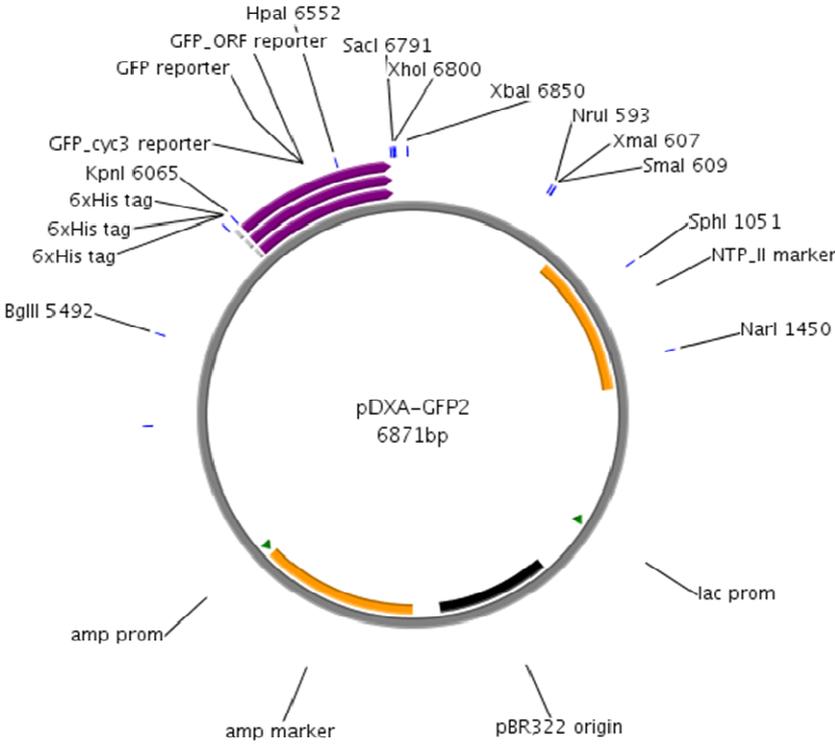


Abbildung 5.9: pDXA-GFP2

5. Material und Geräte

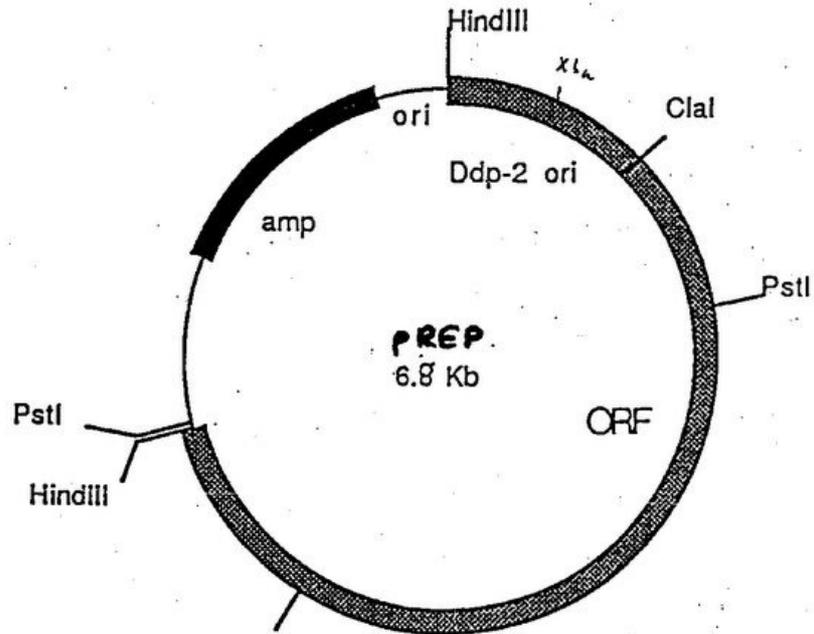


Abbildung 5.10: pREP

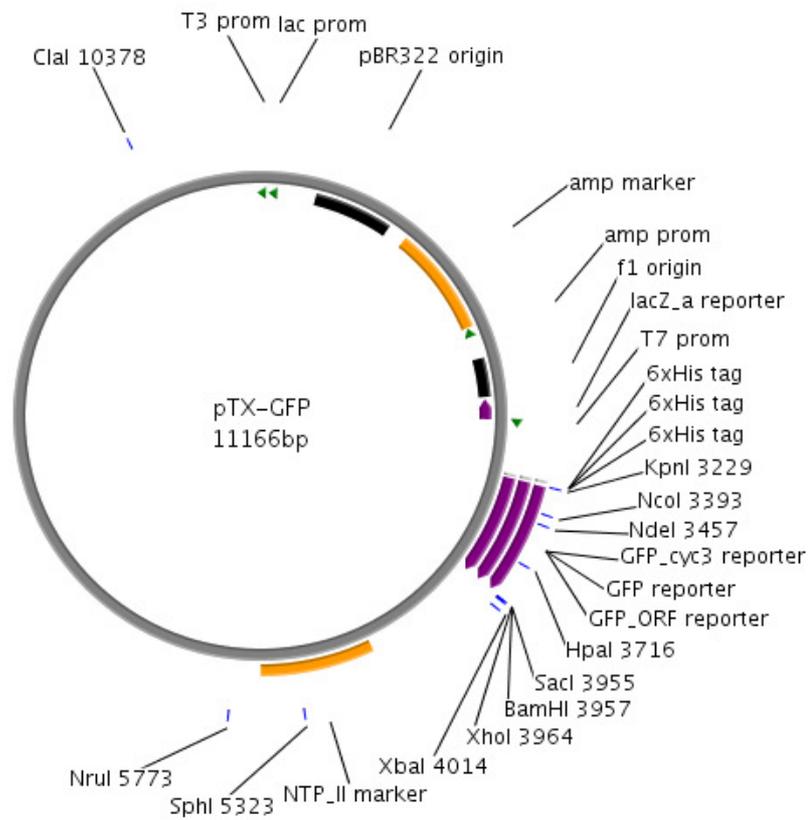


Abbildung 5.11: pTX-GFP

5.6 *Escherichia coli*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
DH5α	F ⁻ φ'80/ <i>lac</i> ZΔ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Hanahan, 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
BL-21-CodonPlus-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>dcm⁺ Tet^r gal endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]	Stratagene
BL-21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> λ(DE3)	Stratagene
BL-21(DE3)pREP4	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pRep4 (Neo ^r)	Novagen

5.7 *Dictyostelium discoideum*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
AX2	214, <i>axeA2</i> , <i>axeB2</i> , <i>axeC2</i>	DBS0235534 dictyBase

5.8 Antikörper

5.8.1 Primärantikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
Anti-Calnexin	Polyklonaler Peptid-Antikörper gegen ein 19 AS-peptid aus der Canine-Calnexin-Sequenz, Kaninchen, Acris (AP03028SU-N)	1: 10.000
Anti-DDAH-1	Polyklonaler Antikörper gegen einen <i>Recombinant Protein Epitope Signature Tag</i> der DDAH 1 Sequenz, 0,2 mg/ml, Kaninchen, Sigma Aldrich (HPA006308)	1: 50.000
Anti-DDAH-2	Polyklonaler Antikörper gegen einen <i>Recombinant Protein Epitope Signature Tag</i> der DDAH-2 Sequenz, 0,06 mg/ml, Kaninchen, Sigma Aldrich (HPA012509)	1: 10.000*

5. Material und Geräte

Anti-GAPDH	Polyklonaler Antikörper gegen die GAPDH-Sequenz, 1 mg/ml, Kaninchen, Abcam (ab9483)	1: 1000
Anti-GFP	Polyklonaler Antikörper gegen die GFP-Sequenz, 0,2 mg/ml, Kaninchen, Santa Cruz (sc-8334)	1: 10.000
Anti-VDAC-2	Polyklonaler Peptid-Antikörper gegen den C-Terminus der VDAC-2-Sequenz, Ziege, Acris (AP16225PU-N)	1: 2.000
Penta-His	Monoklonaler Antikörper gegen den 5×Histidin-Tag, 0,2 mg/ml, Maus, Qiagen (34660)	1: 10.000
RGS-Anti His	Monoklonaler Antikörper gegen den 6×Histidin-Tag, 0,2 mg/ml, Maus, Qiagen (34610)	1: 50.000*

* Abweichungen von den Verdünnungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

5.8.2 Sekundärantikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
Anti-Active® Anti-Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte und die schwere Kette des Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, Esel, Promega (V7951)	1: 10.000
Anti-Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte und die schwere Kette des Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/ml, Ziege, Jackson Immuno Research (111-035-003)	1: 10.000*
Anti-Maus	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte Kette des Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/ml, Ziege, Jackson Immuno Research (115-035-174)	1: 50.000*
Anti-Ziege	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte und die schwere Kette des Ziege IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/ml, Ziege, Jackson Immuno Research (705-035-003)	1: 10.000

* Abweichungen von den Verdünnungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

5.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen sowie das Wasser für molekularbiologische Methoden, alle Nährmedien für *E. coli* und die Zellkultur wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite) oder autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Alle Puffer für die Zellkultur und die Proteinbiochemie wurden bei 4 °C gelagert und bei Bedarf unmittelbar vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

5.9.1 Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

TAE-Puffer (50x)	Ladepuffer für DNA Proben (10x orange)
40 mM Tris-acetat, pH 8,0	0,4 % orange G
1 mM EDTA	30 % Glycerol
	100 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung

- 1 Tablette (100 mg)
- 10 ml *Aqua bidest.* *lichtgeschützt bei 4 °C lagern*

Sequenzierung

TBE-Puffer (10x)

- 0,89 mM Tris-base, pH 8,3
- 0,89 mM Borsäure
- 0,02 mM EDTA

5.9.2 Nährmedien und Puffer für die Zellkultur

E. coli-Zellkultur

LB-Medium	LB- Plattenagar
10 g/l Bacto Trypton	35 g LB-Lennox
10 g/l NaCl	ad 1000 ml <i>Aqua bidest.</i>
5 g/l Hefeextrakt	

Herstellung: 20 g LB-Fertigmedium (Roth) in 1000 ml *Aqua bidest.*

5. Material und Geräte

RM-Medium

10 g/l Bacto Trypton
10 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt
20 g/l Glucose

RM-Plattenagar

35 g LB-Lennox
20 g Glucose
ad 1000 ml *Aqua bidest.*

Herstellung: 20 g LB-Fertigmedium (Roth) mit Glucose-Zusatz in 1000 ml
Aqua bidest.

Name des Antibiotikums	µg/ml Plattenagar
Ampicillin	100
Kanamycin	50
Tetracyclin	15
Chloramphenicol	25

Tabelle 5.1: Antibiotika für die Herstellung von Selektivagarplatten.

PBS-Puffer

137 mM NaCl, pH 7,4
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄

D. discoideum-Zellkultur

HL-5-Medium

14 g/l Pepton
7 g/l Hefeextrakt
0,5 g/l KH₂PO₄
0,5 g/l Na₂HPO₄

Herstellung: 22 g Fertigmedium
(ForMedium™) in 1000 ml *Aqua bidest.*

H50-Puffer

20 mM HEPES, pH 7,0
50 mM KCl
10 mM NaCl
1 mM MgSO₄
5 mM NaHCO₃
1 mM NaH₂PO₄

Sörensen-Phosphat-Puffer (SPB)

15 mM KH_2PO_4 , pH 6,0
2 mM Na_2HPO_4

Sörensen-Phosphat-Agarplatten

15 g Agar-Agar
ad 1000 ml SPB

KK2-Puffer (10x)

140 mM KH_2PO_4
48 mM K_2HPO_4

5.9.3 Allgemeine Proteinchemie

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer (4x)

1,5 M Tris-base, pH 8,8
0,4 % SDS

Sammelgelpuffer (4x)

0,5 M Tris-base, pH 6,8
0,4 % SDS

Kathodenpuffer

25 mM Tris-Base, pH 8,3
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Gel-Trockner-Lösung

50 ml Glycerol
100 ml Ethanol 99 %
350 ml *Aqua bidest.*

Coomassie-Färbelösung

1 g Coomassie-Brilliant Blue R250
50 ml Eisessig
125 ml Isopropanol
ad 500 ml *Aqua bidest.*

Entfärbelösung

10 % Eisessig
30 % Isopropanol

SDS-Ladepuffer (4x)

250 mM Tris-base, pH 6,8
40 % Glycerol
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
400 mM DTT

5. Material und Geräte

Proteinelektroblotting

Transferpuffer (10x)

25 mM Tris-base, pH 8,3

192 mM Glycin

Transferpuffermix

20 % Methanol

10 % 10x Transferpuffer

TBS-T-Puffer

20 mM Tris-base, pH 7,6

137 mM NaCl

0,1 % Tween[®] 20

M-TBST-Puffer

5 % Milchpulver in TBST

Ponceau-Rot-S

1 % Ponceau S

3 % Essigsäure

5.9.4 Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Alle Puffer für die Reinigung wurden unmittelbar vor Benutzung mit 1 mM PMSF versetzt. Alle Puffer für die FPLC-Reinigung wurden nach dem Sterilfiltrieren entgast.

Native, manuelle Reinigung an Ni²⁺-NTA-Agarose

Standard-Lysepuffer

20 mM Na₂HPO₄, pH 8,0

150 mM NaCl

1 mM Benzamidin

2 mM β-Mercaptoethanol

20 % Glycerol

Hochsalzlysepuffer

100 mM Na₂HPO₄, pH 8,0

500 mM NaCl

1 mM Benzamidin

2 mM β-Mercaptoethanol

20 % Glycerol

JL-Lysepuffer

100 mM Na₂HPO₄, pH 6,8

300 mM NaCl

Lysozym-Lösung

100 mM K₂HPO₄, pH 6,3

100 mM KH₂PO₄

5 g/l Lysozym

5. Material und Geräte

Waschpufferstock	Waschpuffer (x mM Imidazol)
100 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,0	50 mM K ₂ HPO ₄
600 mM NaCl	300 mM NaCl
1 mM β-Mercaptoethanol	0,5 mM β-Mercaptoethanol
2 mM Benzamidin	1 mM Benzamidin
2 mM EDTA	1 mM EDTA
20% Glycerol	10% Glycerol
	0-400 mM Imidazol
Imidazol-Stammlösung	PMSF-Stammlösung
10 M Imidazol	100 mM PMSF
<i>Aqua bidest.</i>	Isopropanol

Native FPLC-Reinigung an Ni²⁺-NTA-Agarose

Hochsalzlysepuffer (Äkta)	Waschpuffer
50 mM HEPES, pH 8,0	50 mM HEPES, pH 7,4
300 mM NaCl	300 mM NaCl
1 mM Benzamidin	1 mM Benzamidin
2 mM β-Mercaptoethanol	1 mM β-Mercaptoethanol
20 % Glycerol	10 % Glycerol
Elutionspuffer	
50 mM HEPES, pH 7,4	
300 mM NaCl	
1 mM Benzamidin	
1 mM β-Mercaptoethanol	
500 mM Imidazol	
10% Glycerol	

5. Material und Geräte

Denaturierende, manuelle Reinigung an Ni²⁺-NTA-Agarose

Puffer B

10 mM Tris-base, pH 8,0
100 mM NaH₂PO₄
8 M Harnstoff

Puffer C

10 mM Tris-base, pH 6,3
100 mM NaH₂PO₄,
8 M Harnstoff

Puffer D

10 mM Tris-base, pH 5,9
100 mM NaH₂PO₄
8 M Harnstoff

Puffer E

10 mM Tris-base, pH 4,5
100 mM NaH₂PO₄,
8 M Harnstoff

5.9.5 Thrombinverdau

Puffer für Thrombin-Stock

20 mM Tris-base, pH 7,4
150 mM NaCl

5.9.6 Stabilitätsanalytik GFP

GFP-Lysepuffer nativ

100 mM Na₂HPO₄, pH 8,0
300 mM NaCl

GFP-Lysepuffer denaturierend

10 mM Tris-base, pH 8,0
100 mM NaH₂PO₄,
8 M Harnstoff

5.9.7 Aktivitätsassay

HPLC-Analytik

Fließmittel A

82 % 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 4,65
10 % Acetonitril
8 % Methanol

Fließmittel B

10 % Acetonitril
40 % Methanol
30 % *Aqua bidest.*

Derivatisierungsreagenz

50 mg *o*-Phthaldialdehyd gelöst in 1 ml Methanol

9 ml 0,2 M Kaliumboratpuffer, pH 9,4

53 μ l β -Mercaptoethanol

Kolorimetrischer Plattenreaderassay

Kaliumphosphat-Puffer

25 mM K_2HPO_4 , pH 7,4

25 mM KH_2PO_4

Dinatriumphosphat-Puffer

100 mM Na_2HPO_4 , pH 6,8

Urease-Stock

1000 U Urease

2 ml Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4

Lösung A

80 mM Diacetylmonoxim

2 mM Thiosemicarbazid

Lagerung bei 4 °C, 1 Monat stabil

Lösung B

200 ml 85 %ige H_3PO_4

330 ml 96 %ige H_2SO_4

750 mg $NH_4Fe(SO_4)_2 \times 12 H_2O$

ad 1000 ml *Aqua bidest.*

5.9.8 Präparation zellulärer Subfraktionen porciner Gewebe

TPWL-Puffer

10 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

250 mM Saccharose

1 mM DTT

1 mM EDTA

0,1 % BSA

TPWL-Puffer ohne BSA

10 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

250 mM Saccharose

1 mM DTT

1 mM EDTA

6. Literaturverzeichnis

Achan, V., Tran, C. T. L., Arrigoni, F., Whitley, G. S. J., Leiper, J. M. & Vallance, P. (2002). all-trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation Research* **90**, 764–769.

Achan, V., Broadhead, M., Malaki, M., Whitley, G., Leiper, J., MacAllister, R. & Vallance, P. (2003). Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23**, 1455–1459.

Albano, C. R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W. E. & Rao, G. (1998). Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnology Progress* **14**, 351–354.

Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593–615.

Alkaabi, K. M., Yafea, A. & Ashraf, S. S. (2005). Effect of pH on thermal- and chemical-induced denaturation of GFP. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **126**, 149–156.

Altmann, K. S. (2009). Rekombinante Expression der humanen Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-2. Diplomarbeit. Kiel.

Anthony, S., Leiper, J. & Vallance, P. (2005). Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vascular Medicine* **10 Suppl 1**, S3-S9.

Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. & Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3203–3207.

Ash, D. E. (2004). Structure and function of arginases. *Journal of Nutrition* **134**, 2760S-2767S.

Babu, B. R. & Griffith, O. W. (1998a). Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 491–500.

Babu, B. R. & Griffith, O. W. (1998b). N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 8882–8889.

Bagi, Z., Feher, A., Dou, H. & Broskova, Z. (2013). Selective Up-Regulation of Arginase-1 in Coronary Arteries of Diabetic Patients. *Frontiers in Immunology* **4**, 293.

- Baneyx, F. (1999).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 411–421.
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004).** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **22**, 1399–1408.
- Bauer, M. C., O'Connell, D. J., Maj, M., Wagner, L., Cahill, D. J. & Linse, S. (2011).** Identification of a high-affinity network of secretagogin-binding proteins involved in vesicle secretion. *Molecular BioSystems* **7**, 2196–2204.
- Bedford, M. T. & Clarke, S. G. (2009).** Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell* **33**, 1–13.
- Birdsey, G. M., Leiper, J. M. & Vallance, P. (2000).** Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiologica Scandinavica* **168**, 73–79.
- Bode-Böger, S. M., Böger, R. H., Galland, A., Tsikas, D. & Frölich, J. C. (1998).** L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *British Journal of Clinical Pharmacology* **46**, 489–497.
- Böger, R. H. (2004).** Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *Journal of Nutrition* **134**, 2842S–2847S.
- Böger, R. H. & Ron, E. S. (2005).** L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Alternative Medicine Review: a journal of clinical therapeutics* **10**, 14–23.
- Bogumil, R., Knipp, M., Fundel, S. M. & Vasák, M. (1998).** Characterization of dimethylargininase from bovine brain: evidence for a zinc binding site. *Biochemistry* **37**, 4791–4798.
- Bokman, S. H. & Ward, W. W. (1981).** Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **101**, 1372–1380.
- Bolanos-Garcia, V. M. & Davies, O. R. (2006).** Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1760**, 1304–1313.
- Boucher, J. L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Henry, Y. & Mansuy, D. (1992).** Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **187**, 880–886.

6. Literaturverzeichnis

- Boucher, J. L., Custot, J., Vadon, S., Delaforge, M., Lepoivre, M., Tenu, J. P., Yapo, A. & Mansuy, D. (1994).** N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **203**, 1614–1621.
- Buga, G. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. & Ignarro, L. J. (1993).** Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circulation Research* **73**, 808–812.
- Caplin, B. & Leiper, J. (2012).** Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: markers, mediators, and regulators? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **32**, 1343–1353.
- Castillo, L., Beaumier, L., Ajami, A. M. & Young, V. R. (1996).** Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11460–11465.
- Chen, Y., Li, Y., Zhang, P., Traverse, J. H., Hou, M., Xu, X., Kimoto, M. & Bache, R. J. (2005).** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase and endothelial dysfunction in failing hearts. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **289**, H2212–H2219.
- Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. & Jothianandan, D. (1982).** Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2106–2110.
- Cillero-Pastor, B., Mateos, J., Fernandez-Lopez, C., Oreiro, N., Ruiz-Romero, C. & Blanco, F. (2012).** Dimethylargininase-2, a newly identified mitochondrial protein modulating nitric oxide synthesis in normal human chondrocytes. *Arthritis and rheumatism* **64**, 204–212.
- Clement, B., Mau, S., Deters, S. & Havemeyer, A. (2005).** Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the N-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2S)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyloxy]-acetic acid). *Drug Metabolism and Disposition* **33**, 1740–1747.
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. (1993).** Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212–1218.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 2110–2114.

- Colasanti, M. & Suzuki, H. (2000).** The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 249–252.
- Crabtree, M. J. & Channon, K. M. (2011).** Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide* **25**, 81–88.
- Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S. & Cynober, L. (2005).** Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* **29**, 177–205.
- Daiber, A., Wenzel, P., Oelze, M. & Münzel, T. (2008).** New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clinical Research in Cardiology* **97**, 12–20.
- Dayoub, H., Achan, V., Adimoolam, S., Jacobi, J., Stuehlinger, M. C., Wang, B.-y., Tsao, P. S., Kimoto, M. & Vallance, P. & other authors (2003).** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* **108**, 3042–3047.
- Doyle, M. P. & Hoekstra, J. W. (1981).** Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **14**, 351–358.
- Duncan, A. & Heales, S. (2005).** Nitric oxide and neurological disorders. *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 67–96.
- Durante, W., Johnson, F. K. & Johnson, R. A. (2007).** Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* **34**, 906–911.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R. & Szafranski, K. & other authors (2005).** The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**, 43–57.
- Enfors, S. O. (1992).** Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends in Biotechnology* **10**, 310–315.
- Fast W.** University of Austin, Texas. Persönliche Kommunikation
- Feng, M., Liu, L., Guo, Z. & Xiong, Y. (2008).** Gene transfer of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 improves the impairments of DDAH/ADMA/NOS/NO pathway in endothelial cells induced by lysophosphatidylcholine. *European Journal of Pharmacology* **584**, 49–56.
- Feng, M., He, Z.-M., Zhu, Y.-X., Liu, L.-H., Lu, C.-W. & Xiong, Y. (2010).** Improvement of endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbit aortas by ex vivo gene transferring of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2. *International Journal of Cardiology* **144**, 180–186.

6. Literaturverzeichnis

- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E. & Villaverde, A. (2009).** Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* **8**, 17.
- Frey, D., Braun, O., Briand, C., Vasák, M. & Grütter, M. G. (2006).** Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Structure* **14**, 901–911.
- Fundel, S. M., Pountney, D. L., Bogumil, R., Gehrig, P. M., Hasler, D. W., Faller, P. & Vasák, M. (1996).** Isolation and characterization of a novel monomeric zinc- and heme-containing protein from bovine brain. *FEBS Letters* **395**, 33–38.
- Furchgott, R. F. (1996).** The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA: the journal of the American Medical Association* **276**, 1186–1188.
- Gad, M. Z., Hassanein, S. I., Abdel-Maksoud, S. M., Shaban, G. M. & Abou-Aisha, K. (2011).** Association of DDAH2 gene polymorphism with cardiovascular disease in Egyptian patients. *Journal of Genetics* **90**, 161–163.
- Garbin, U., Pasini, A. F., Stranieri, C., Manfro, S., Boccioletti, V. & Cominacini, L. (2007).** Nebivolol reduces asymmetric dimethylarginine in endothelial cells by increasing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) expression and activity. *Pharmacological Research* **56**, 515–521.
- Ghafourifar, P. & Cadenas, E. (2005).** Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences* **26**, 190–195.
- Ghebremariam, Y. T., Erlanson, D. A., Yamada, K. & Cooke, J. P. (2012).** Development of a Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH) Assay for High-Throughput Chemical Screening. *Journal of Biomolecular Screening* **17**, 651–661.
- Ghebremariam, Y. T., Yamada, K., Lee, J. C., Johnson, C. L. C., Atzler, D., Anderssohn, M., Agrawal, R., Higgins, J. P. & Patterson, A. J. & other authors (2013).** FXR Agonist INT-747 Upregulates DDAH Expression and Enhances Insulin Sensitivity in High-Salt Fed Dahl Rats. *PLOS ONE* **8**, e60653.
- Gray, G. A., Patrizio, M., Sherry, L., Miller, A. A., Malaki, M., Wallace, A. F., Leiper, J. M. & Vallance, P. (2010).** Immunolocalisation and activity of DDAH I and II in the heart and modification post-myocardial infarction. *Acta Histochemica* **112**, 413–423.
- Hallemeesch, M. M., Lamers, W. H. & Deutz, N. E. P. (2002).** Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clinical Nutrition* **21**, 273–279.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.

Harris, M. B., Blackstone, M. A., Sood, S. G., Li, C., Goolsby, J. M., Venema, V. J., Kemp, B. E. & Venema, R. C. (2004). Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **287**, H560-H566.

Hartzoulakis, B., Rossiter, S., Gill, H., O'Hara, B., Steinke, E., Gane, P. J., Hurtado-Guerrero, R., Leiper, J. M. & Vallance, P. & other authors (2007). Discovery of inhibitors of the ptein superfamily protein dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), by virtual screening and hit analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**, 3953–3956.

Harvey, R. J. & Koch, A. L. (1980). How partially inhibitory concentrations of chloramphenicol affect the growth of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**, 323–337.

Hasegawa, K., Wakino, S., Tanaka, T., Kimoto, M., Tatematsu, S., Kanda, T., Yoshioka, K., Homma, K. & Sugano, N. & other authors (2006). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1488–1494.

Hasegawa, K., Wakino, S., Tatematsu, S., Yoshioka, K., Homma, K., Sugano, N., Kimoto, M., Hayashi, K. & Itoh, H. (2007). Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. *Circulation Research* **101**, e2-e10.

Hasegawa, K., Wakino, S., Kimoto, M., Minakuchi, H., Fujimura, K., Hosoya, K., Komatsu, M., Kaneko, Y. & Kanda, T. & other authors (2013). The hydrolase DDAH2 enhances pancreatic insulin secretion by transcriptional regulation of secretagogin through a Sirt1-dependent mechanism in mice. *FASEB Journal* **27**, 2301-2315.

Heitzer, T., Krohn, K., Albers, S. & Meinertz, T. (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* **43**, 1435–1438.

Hoang, H. H., Padgham, S. V. & Meininger, C. J. (2013). L-arginine, tetrahydrobiopterin, nitric oxide and diabetes. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **16**, 76–82.

Holowatz, L. A. & Kenney, W. L. (2007). Up-regulation of arginase activity contributes to attenuated reflex cutaneous vasodilatation in hypertensive humans. *Journal of Physiology* **581**, 863–872.

Hong, L. & Fast, W. (2007). Inhibition of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 by S-nitroso-L-homocysteine and hydrogen peroxide. Analysis, quantification, and implications for hyperhomocysteinemia. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 34684–34692.

6. Literaturverzeichnis

Hovius, R., Lambrechts, H., Nicolay, K. & Kruijff, B. de (1990). Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1021**, 217–226.

Hu, T., Chouinard, M., Cox, A. L., Sipes, P., Marcelo, M., Ficorilli, J., Li, S., Gao, H. & Ryan, T. P. & other authors (2006). Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 39831–39838.

Hu, X., Atzler, D., Xu, X., Zhang, P., Guo, H., Lu, Z., Fassett, J., Schwedhelm, E. & Böger, R. H. & other authors (2011). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, 1540–1546.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 9265–9269.

Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **34**, 879–886.

Jenkinson, C. P., Grody, W. W. & Cederbaum, S. D. (1996). Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* **114**, 107–132.

Jenny, R. J., Mann, K. G. & Lundblad, R. L. (2003). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expression and Purification* **31**, 1–11.

Johnson, C. M., Linsky, T. W., Yoon, D.-W., Person, M. D. & Fast, W. (2011a). Discovery of halopyridines as quiescent affinity labels: inactivation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 1553–1562.

Johnson, C. M., Monzingo, A. F., Ke, Z., Yoon, D.-W., Linsky, T. W., Guo, H., Robertus, J. D. & Fast, W. (2011b). On the mechanism of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inactivation by 4-halopyridines. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 10951–10959.

Kanyo, Z. F., Scolnick, L. R., Ash, D. E. & Christianson, D. W. (1996). Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* **383**, 554–557.

Kimoto, M., Miyatake, S., Sasagawa, T., Yamashita, H., Okita, M., Oka, T., Ogawa, T. & Tsuji, H. (1998). Purification, cDNA cloning and expression of human NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *European Journal of Biochemistry/FEBS* **258**, 863–868.

Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P. & Kabanova, S. & other authors (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* **107**, 2943–2951.

Knipp, M. & Vasák, M. (2000). A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Analytical Biochemistry* **286**, 257–264.

Knipp, M., Charnock, J. M., Garner, C. D. & Vasák, M. (2001). Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40449–40456.

Knipp, M., Braun, O. & Vasák, M. (2005). Searching for DDAH inhibitors: S-nitroso-L-homocysteine is a chemical lead. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 2372–2373.

Knipp, M. (2006). How to control NO production in cells: N(omega),N(omega)-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target. *ChemBioChem* **7**, 879–889.

Knipp, M. (2007). Toward the development of inhibitors directed against mammalian DDAH proteins: Considerations from homology modeling of DDAH-2 and DDAH activity tracing in tissue homogenate. *Letters in Drug Design & Discovery* **4**, 570–579.

Knowles, R. G. & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298 (Pt 2)**, 249–258.

Konishi, H., Sydow, K. & Cooke, J. P. (2007). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. *Journal of the American College of Cardiology* **49**, 1099–1105.

Korbie, D. J. & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* **3**, 1452–1456.

Koshland, D. E. (1992). The molecule of the year. *Science* **258**, 1861.

Kotthaus, J. (2008). Substituierte L-Arginin-Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxidgenerierenden Systems. Dissertation. Kiel.

6. Literaturverzeichnis

Kotthaus, J., Schade, D., Muschick, N., Beitz, E. & Clement, B. (2008). Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 10205–10209.

Kotthaus, J., Schade, D., Kotthaus, J. & Clement, B. (2011a). Designing modulators of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): A focus on selectivity over arginase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **27**, 24–28.

Kotthaus, J., Wahl, B., Havemeyer, A., Kotthaus, J., Schade, D., Garbe-Schönberg, D., Mendel, R., Bittner, F. & Clement, B. (2011b). Reduction of N ω -hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochemical Journal* **433**, 383–391.

Krause, C. D., Yang, Z.-H., Kim, Y.-S., Lee, J.-H., Cook, J. R. & Pestka, S. (2007). Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics* **113**, 50–87.

Krischkowski, C. (2010). mARC-Expression und N-reduktive Aktivität in hepatischen und extrahepatischen Organen. Diplomarbeit. Kiel.

Kuo, W.-H. K. & Chase, H. A. (2011). Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnology Letters* **33**, 1075–1084.

Kyratsous, C. A., Silverstein, S. J., DeLong, C. R. & Panagiotidis, C. A. (2009). Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **440**, 9–15.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680–685.

Leiper, J. M., Santa Maria, J., Chubb, A., MacAllister, R. J., Charles, I. G., Whitley, G. S. & Vallance, P. (1999). Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochemical Journal* **343 Pt 1**, 209–214.

Leiper, J. & Vallance, P. (1999). Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* **43**, 542–548.

Leiper, J., Murray-Rust, J., McDonald, N. & Vallance, P. (2002). S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13527–13532.

Leiper, J., Nandi, M., Torondel, B., Murray-Rust, J., Malaki, M., O'Hara, B., Rossiter, S., Anthony, S. & Madhani, M. & other authors (2007). Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nature Medicine* **13**, 198–203.

Levi, S., Polyakov, M. & Egelhoff, T. T. (2000). Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid* **44**, 231–238.

Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J. & Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* **41**, 98–105.

Lim, C. R., Kimata, Y., Oka, M., Nomaguchi, K. & Kohno, K. (1995). Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal novel nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1. *Journal of Biochemistry* **118**, 13–17.

Linsky, T., Wang, Y. & Fast, W. (2011). Screening for Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Inhibitors Reveals Ebselen as a Bioavailable Inactivator. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2**, 592–596.

Litty, F. A. Dissertation in Vorbereitung. Kiel.

Lluis, M., Wang, Y., Monzingo, A. F., Fast, W. & Robertus, J. D. (2011). Characterization of C-alkyl amidines as bioavailable covalent reversible inhibitors of human DDAH-1. *ChemMedChem* **6**, 81–88.

Loscalzo, J. (2013). The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circulation Research* **113**, 100–103.

Lu, C.-W., Xiong, Y. & He, P. (2007). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 overexpression improves impaired nitric oxide synthesis of endothelial cells induced by glycated protein. *Nitric Oxide* **16**, 94–103.

Lunk, I. (2012). Entwicklung neuer Inhibitoren der Enzyme Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase und Arginase. Dissertation. Kiel.

Lunney, J. K. (2007). Advances in Swine Biomedical Model Genomics. *International Journal of Biological Sciences* **3**, 179–184.

Maarsingh, H., Zuidhof, A. B., Bos, I. S. T., van Duin, M., Boucher, J.-L., Zaagsma, J. & Meurs, H. (2008). Arginase Inhibition Protects against Allergen-induced Airway Obstruction, Hyperresponsiveness, and Inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **178**, 565–573.

6. Literaturverzeichnis

- MacAllister, R. J., Parry, H., Kimoto, M., Ogawa, T., Russell, R. J., Hodson, H., Whitley, G. S. & Vallance, P. (1996).** Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *British Journal of Pharmacology* **119**, 1533–1540.
- Makrides, S. C. (1996).** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **60**, 512–538.
- Marco, A. de, Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (2007).** Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnology* **7**, 32.
- Michell, B. J., Chen Zp, Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A., Sim, A. T. & Kemp, B. E. (2001).** Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 17625–17628.
- Michel, T. (1999).** Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Reserach* **32**, 1361–1366.
- Middelberg, A. P. J. (2002).** Preparative protein refolding. *Trends in Biotechnology* **20**, 437–443.
- Miyazaki, H., Matsuoka, H., Cooke, J. P., Usui, M., Ueda, S., Okuda, S. & Imaizumi, T. (1999).** Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* **99**, 1141–1146.
- Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. (1991).** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* **43**, 109–142.
- Morris, S. M. (2004).** Enzymes of arginine metabolism. *Journal of Nutrition* **134**, 2743S–2767S.
- Mullally, A. & Ebert, B. L. (2010).** NF1 Inactivation Revs Up Ras in Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research* **16**, 4074–4076.
- Müller-Lucks, A., Bock, S., Wu, B., Beitz, E. & Kursula, P. (2012).** Fluorescent In Situ Folding Control for Rapid Optimization of Cell-Free Membrane Protein Synthesis. *PLOS ONE* **7**, e42186.
- Murad, F. (2008).** Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling in the eye. *Canadian Journal of Ophthalmology* **43**, 291–294.
- Murray-Rust, J., Leiper, J., McAlister, M., Phelan, J., Tilley, S., Santa Maria, J., Vallance, P. & McDonald, N. (2001).** Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nature Structural Biology* **8**, 679–683.

- Nandi, M., Kelly, P., Torondel, B., Wang, Z., Starr, A., Ma, Y., Cunningham, P., Stidwill, R. & Leiper, J. (2012).** Genetic and Pharmacological Inhibition of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 Is Protective in Endotoxic Shock. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **32**, 2589–2597.
- Newstead, S., Kim, H., Heijne, G. von, Iwata, S. & Drew, D. (2007).** High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13936–13941.
- Nishimura, H., Rosenblum, W. I., Nelson, G. H. & Boynton, S. (1991).** Agents that modify EDRF formation alter antiplatelet properties of brain arteriolar endothelium in vivo. *American Journal of Physiology* **261**, H15-H21.
- Ogawa, T., Kimoto, M. & Sasaoka, K. (1987).** Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochemical Biophysical Research Communication* **148**, 671–677.
- Ogawa, T., Kimoto, M. & Sasaoka, K. (1989).** Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 10205–10209.
- Olesen, J. (2010).** Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics* **7**, 183–190.
- Paik, W. K. & Kim, S. (1968).** Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 2108–2114.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. (1987).** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S. & Moncada, S. (1988).** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664–666.
- Palm, F., Onozato, M. L., Luo, Z. & Wilcox, C. S. (2007).** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **293**, H3227-H3245.
- Park, K., Lee, D. G., Kim, S. W. & Paick, J.-S. (2009).** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rat penile tissue: reduced enzyme activity is responsible for erectile dysfunction in a rat model of atherosclerosis. *International Journal of Impotence Research* **21**, 228–234.

6. Literaturverzeichnis

- Plevin, M. J., Magalhães, B. S., Harris, R., Sankar, A., Perkins, S. J. & Driscoll, P. C. (2004).** Characterization and manipulation of the *Pseudomonas aeruginosa* dimethylarginine dimethylaminohydrolase monomer-dimer equilibrium. *Journal of Molecular Biology* **341**, 171–184.
- Pope, A. J., Karuppiyah, K. & Cardounel, A. J. (2009a).** Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacological Research* **60**, 461–465.
- Pope, A. J., Karpupiah, K., Kearns, P. N., Xia, Y. & Cardounel, A. J. (2009b).** Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 35338–35347.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. & Moncada, S. (1987).** The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* **92**, 639–646.
- Rajfer, J., Aronson, W. J., Bush, P. A., Dorey, F. J. & Ignarro, L. J. (1992).** Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *New England Journal of Medicine* **326**, 90–94.
- Rodionov, R. N., Murry, D. J., Vulman, S. F., Stevens, J. W. & Lentz, S. R. (2010).** Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 5385–5391.
- Rohrer, G., Beever, J. E., Rothschild, M. F., Schook, L., Gibbs, R. & Weinstein, G.** Porcine Genomic Sequencing Initiative.
www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/PorcineSEQ021203.pdf.
- Rossiter, S., Smith, C. L., Malaki, M., Nandi, M., Gill, H., Leiper, J. M., Vallance, P. & Selwood, D. L. (2005).** Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Journal of Medicinal Chemistry* **48**, 4670–4678.
- Rubanyi, G. M. & Vanhoutte, P. M. (1986).** Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology* **250**, H822–H827.
- Sakurada, M., Shichiri, M., Imamura, M., Azuma, H. & Hirata, Y. (2008).** Nitric oxide upregulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 via cyclic GMP induction in endothelial cells. *Hypertension* **52**, 903–909.
- Santa Maria, J., Vallance, P., Charles, I. G. & Leiper, J. M. (1999).** Identification of microbial dimethylarginine dimethylaminohydrolase enzymes. *Molecular Microbiology* **33**, 1278–1279.

Schade, D., Kotthaus, J. & Clement, B. (2010). Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* **126**, 279–300.

Schulman, S. P., Becker, L. C., Kass, D. A., Champion, H. C., Terrin, M. L., Forman, S., Ernst, K. V., Kelemen, M. D. & Townsend, S. N. & other authors (2006). L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA: the journal of the American Medical Association* **295**, 58–64.

Sharp, P. M. & Devine, K. M. (1989). Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum*: highly expressed genes do 'prefer' optimal codons. *Nucleic Acids Research* **17**, 5029–5039.

Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223–239.

Shirai, H., Blundell, T. L. & Mizuguchi, K. (2001). A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanidino groups. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 465–468.

Siddhanta, U. (1998). Domain Swapping in Inducible Nitric-oxide Synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 18950–18958.

Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. & Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* **6**, 1653–1663.

Singh, S. M. & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 303–310.

Sirover, M. A. (2012). Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: Mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *Journal of Cellular Biochemistry* **113**, 2193–2200.

Slade, M. B., Emslie, K. R. & Williams, K. L. (1997). Expression of recombinant glycoproteins in the simple eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **14**, 1–35.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85.

SoRelle, R. (1998). Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries. *Circulation* **98**, 2365–2366.

6. Literaturverzeichnis

Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**, 113–128.

Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005b). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factory* **4**, 1.

Steppan, J., Nyhan, D. & Berkowitz, D. E. (2013). Development of Novel Arginase Inhibitors for Therapy of Endothelial Dysfunction. *Frontiers in Immunology* **4**, 278.

Stone, E. M., Person, M. D., Costello, N. J. & Fast, W. (2005). Characterization of a transient covalent adduct formed during dimethylarginine dimethylaminohydrolase catalysis. *Biochemistry* **44**, 7069–7078.

Straus, B., Cepelak, I. & Festa, G. (1992). Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clinica Chimica Acta* **210**, 5–12.

Stuehr, D. J. (2004). Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *Journal of Nutrition* **134**, 2748S–2751S.

Tain, Y.-L. & Baylis, C. (2007). Determination of dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in the kidney. *Kidney International* **72**, 886–889.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 523–533.

Thiemermann, C. (1997). Nitric oxide and septic shock. *General Pharmacology* **29**, 159–166.

**Tojo, A., Welch, W. J., Bremer, V., Kimoto, M., Kimura, K., Omata, M., Oga-
wa, T., Vallance, P. & Wilcox, C. S. (1997).** Colocalization of demethylating en-
zymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Inter-
national* **52**, 1593–1601.

**Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H. &
Araki, N. (2001).** Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein
kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine
dimethylaminohydrolase. *FEBS Letters* **494**, 48–53.

Tran, C. T., Fox, M. F., Vallance, P. & Leiper, J. M. (2000). Chromosomal locali-
zation, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2
and implications for evolutionary origins. *Genomics* **68**, 101–105.

Tran, C. T. L., Leiper, J. M. & Vallance, P. (2003). The DDAH/ADMA/NOS path-
way. *Atherosclerosis Supplemental* **4**, 33–40.

- Ueda, S., Kato, S., Matsuoka, H., Kimoto, M., Okuda, S., Morimatsu, M. & Imaizumi, T. (2003).** Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation Research* **92**, 226–233.
- Valkonen, V.-P., Tuomainen, T.-P. & Laaksonen, R. (2005).** DDAH gene and cardiovascular risk. *Vascular Medicine* **10 Suppl 1**, S45-S48.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J. & Moncada, S. (1992).** Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339**, 572–575.
- Vallance, P., Bush, H. D., Mok, B. J., Hurtado-Guerrero, R., Gill, H., Rossiter, S., Wilden, J. D. & Caddick, S. (2005).** Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates. *Chemical Communications*, 5563–5565.
- Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A., Jackson, M. R. & Williams, D. B. (1996).** The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO Journal* **15**, 1495–1506.
- Wakino, S., Hayashi, K., Tatematsu, S., Hasegawa, K., Takamatsu, I., Kanda, T., Homma, K., Yoshioka, K., Sugano, N. & Saruta, T. (2005).** Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats. *Hypertension Research* **28**, 255–262.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C. (1999).** Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **17**, 691–695.
- Wall, J. G. & Plückthun, A. (1995).** Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 507–516.
- Wang, D., Gill, P. S., Chabrashvili, T., Onozato, M. L., Raggio, J., Mendonca, M., Dennehy, K., Li, M. & Modlinger, P. & other authors (2007).** Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circulation Research* **101**, 627–635.
- Wang, J., Sim, A. S., Wang, X. L. & Wilcken, D. E. L. (2006).** L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 2838–2846.
- Wang, Y. M. A. H. S. S. T. R. J. F. W. (2009).** Crystal structure of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH-1). <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3I2E>.

6. Literaturverzeichnis

- Wang, Y., Monzingo, A. F., Hu, S., Schaller, T. H., Robertus, J. D. & Fast, W. (2009).** Developing dual and specific inhibitors of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and nitric oxide synthase: toward a targeted polypharmacology to control nitric oxide. *Biochemistry* **48**, 8624–8635.
- Waugh, D. S. (2005).** Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology* **23**, 316–320.
- Williams, R. S., Boeckeler, K., Gräf, R., Müller-Taubenberger, A., Li, Z., Isberg, R. R., Wessels, D., Soll, D. R., Alexander, H. & Alexander, S. (2006).** Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends in Molecular Medicine* **12**, 415–424.
- Wu, G. & Morris, S. M. (1998).** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* **336**, 1–17.
- Wu, H. M., Yuan, Y., Zawieja, D. C., Tinsley, J. & Granger, H. J. (1999).** Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *American Journal of Physiology* **276**, H535-H542.
- Yip, M. C. & Knox, W. E. (1972).** Function of arginase in lactating mammary gland. *Biochemical Journal* **127**, 893–899.
- Zakrzewicz, D. & Eickelberg, O. (2009).** From arginine methylation to ADMA: a novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC Pulmonary Medicine* **9**, 5.
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E. S., Azoulay-Zohar, H. & Shoshan-Barmatz, V. (2005).** Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochemical Journal* **386**, 73-83.
- Zhang, P., Hu, X., Xu, X., Chen, Y. & Bache, R. J. (2011).** Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 modulates endothelial cell growth through nitric oxide and Akt. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, 890–897.
- Zoccali, C. (2007).** The endothelium as a target in renal diseases. *Journal of Nephrology* **20 Suppl 12**, S39-S44.
- Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. (1995).** Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature Medicine* **1**, 804–809.

Erklärung zu § 7 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Arbeit 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.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Altmann, K.S., Havemeyer A., Beitz, E., Clement B. (2012)

Dimethylarginine-Dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) Does Not Metabolize Methylarginines. *ChemBioChem* **13**, 2599-2604.

Altmann, K.S., Havemeyer A., Beitz, E., Clement B. (2012)

Is Dimethylarginine-Dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) involved in methylarginine metabolism? DPhG Jahrestagung, Greifswald

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft entstanden.

Kiel, im Januar 2014

Karin Altmann

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, das mir überlassene interessante Thema, die Freiheit bei der Gestaltung und seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Entstehung dieser Arbeit möchte ich meinem Doktorvater herzlich danken.

Prof. Dr. Eric Beitz und Prof. Dr. Thomas Kunze danke ich für ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft und ihre zahlreichen wertvollen Ratschläge. Dr. Julia von Bülow und Dr. Binghua Wu danke ich für ihre engagierte Unterstützung und hilfreichen Anregungen bei allen Arbeiten zum rekombinanten Protein.

Für die Möglichkeit und die Hilfe bei der FPLC-Reinigung am Institut für Strukturbiologie der CAU Kiel bedanke ich mich bei Prof. Dr. Axel Scheidig und seinen Mitarbeitern. Carmen Krischkowski und Dr. Antje Havemeyer danke ich für die zur Verfügung gestellten subzellulären Fraktionen.

Mein großer Dank gilt Thomas Behrendt, der mir als Mitarbeiter bei der gesamten Protein- und Aktivitätsanalytik zur Seite stand und mich als Freund immer wieder mit Tee und Keksen motiviert hat. Bei Sven Wichmann bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Analytik. Ebenso gilt mein großer Dank Björn Henke und Dina Quitzau für die Unterstützung bei allen Arbeiten mit DNA, Bakterien und Zellkultur.

Bei Heyka, Eva und Julia bedanke ich mich für das zügige Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik. Mein Dank gilt auch Felix für die unermüdliche Erstellung der Strukturformeln für diese Arbeit und als toller Partner im DDAH-Projekt.

Vielen Dank auch an Nina, Juliane, Eva, Birte, Stefan, Merle, Thomas K. und Thomas B. für die unterhaltsame und gute Zusammenarbeit bei der Semesterbetreuung.

Julia HB, Julia vB, Ellen, Sinja, Jannis, Andre, Danilo, Nina, Heyka, Tineke und Lukas danke ich für die tollen Mittagsstunden, die immer witzig und manchmal schön schräg für Abwechslung im Forschungsalltag gesorgt haben.

Danksagung

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Arbeitskreis und insbesondere der „NO-Phenantridin-Gruppe“ für das nette Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Kristina, Thomas, Helle, Susanne, Heyka und Eva bedanken, die immer für mich da waren, mich immer wieder motivierten und damit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank für alles!

Mein größter Dank gilt meiner Familie- ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	<u>Karin</u> Susanne Altmann
Geburtsdatum	14. Februar 1985
Geburtsort	Röbel/ Müritz
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1991 bis 1995	Realschule mit Haupt- und Grundschulteil „Friedrich Blohm“, Kogel
1995 bis 2004	Fleesensee-Gymnasium Malchow

Studium

Okt. 2004 bis Nov. 2008	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Januar bis Juni 2009	Anfertigung einer Diplomarbeit in der Pharmazeutischen Chemie Kiel unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
Juli bis Dezember 2009	Pharmaziepraktikum in der Belvedere-Apotheke, Kiel
September 2009	Erlangung der Grades „Diplom-Pharmazeut“
Januar 2010	Erteilung der Approbation als Apotheker

Promotion

seit April 2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement Weiterbildung zur Fachapothekerin für pharmazeutische Analytik
-----------------	---

In den letzten Jahren wurden verschiedene Wege zur Therapie pathophysiologisch erhöhter Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentrationen entwickelt. NO wird aus L-Arginin über die NO-Synthasen (NOS) hergestellt, deren direkte Hemmung derzeit therapeutisch nicht genutzt werden kann. Als Alternative wurde daher die Hemmung der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) und die Akkumulation ihrer Substrate N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) und $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA), die endogen die NOS-Enzyme hemmen, interessant. Da nur die mit der DDAH-1 colokalisierte neuronale und induzierbare NOS gehemmt werden soll, werden selektive DDAH-1-Inhibitoren benötigt.

Für die Analyse der Isoformen-Selektivität bekannter DDAH-Hemmstoffe wurden die humanen DDAH-Isoformen rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt. Um die Aktivität der Proteine zu prüfen, wurden sie mit den postulierten DDAH-Substraten inkubiert. Im Gegensatz zur rekombinanten hDDAH-1 setzte die hDDAH-2 weder L-NMMA und ADMA, noch die alternativ getesteten Substrate *S*-Methyl-L-thiocitrullin (SMTC) und N^{ω} -Amino-L-arginin zu L-Citrullin um.

Da es nicht immer gelingt humane Proteine in *E. coli* funktionsfähig herzustellen, konnte nach den Ergebnissen nicht sicher von einem Fehlen endogener Enzymaktivität ausgegangen werden. Allerdings wurde die hydrolytische Aktivität der DDAH-2 bereits zu Beginn dieser Arbeit kontrovers diskutiert. Daher wurden Untersuchungen mit den nativen DDAH-Isoformen in porcinem Gewebe durchgeführt. Mittels Western Blot-Analysen wurden eine unterschiedliche Organverteilung für die DDAH-Enzyme ermittelt und repräsentative Gewebe für die Untersuchung der Aktivität nativer DDAHs identifiziert: Die Schilddrüse für die DDAH-2 und die Niere für die DDAH-1. Bei Inkubation aller Gewebe mit ADMA und der Schilddrüse und Niere mit allen vier Substraten, konnte native DDAH-2, im Gegensatz zur DDAH-1, kein Substrat zu L-Citrullin abbauen.

Die Ergebnisse der Studien mit nativen und rekombinanten DDAH-Isoformen belegten somit übereinstimmend, dass DDAH-2 keine endogene hydrolytische Aktivität für L-NMMA und ADMA aufweist. Der postulierte Metabolismus ist daher nicht als Aktivitätsassay für die DDAH-2 und zur Testung der Isoformen-Selektivität von DDAH-Inhibitoren geeignet. Die physiologische Funktion der DDAH-2 und der Mechanismus über den sie den NO-Stoffwechsel beeinflusst müssen nun weiter erforscht werden.

Summary

In the last years, different strategies were developed for the therapy of diseases based on pathophysiologically raised nitric oxide (NO) concentrations. NO is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase isoenzymes (NOS). Until today, a direct inhibition of NOS to attenuate pathophysiological NO-concentrations is limited by side effects of NOS-inhibitors. Therefore, the inhibition of dimethylarginin-dimethylaminohydrolase (DDAH) followed by an accumulation of its substrates N^{ω} -methyl-L-arginine (L-NMMA) und $N^{\omega},N^{\omega'}$ -dimethyl-L-arginine (ADMA) which are endogenous inhibitors of all NOS-enzymes was a favored alternative. For therapy, exclusive inhibition of inducible NOS (iNOS) and neuronal NOS (nNOS) is crucial. Hence, due to the colocalisation of nNOS/iNOS with DDAH-1, solely selective DDAH-1-inhibitors are of therapeutic interest.

To study the isoform selectivity of known DDAH-inhibitors, human DDAH isoforms are expressed and purified from *E. coli*. The activity of the enzymes was measured by degradation of the postulated DDAH substrates L-NMMA, ADMA, and alternative substrates *S*-methyl-L-thiocitrulline (SMTC), and N^{ω} -amino-L-arginine to L-citrulline. In contrast to hDDAH-1, neither methylarginines nor alternative substrates were metabolized by recombinant hDDAH-2.

Expression of nonfunctional human proteins in *E. coli* is a common problem, thus the observed lack of intrinsic activity could not reliably be interpreted as an actual state of the enzyme. However, recent works have raised doubts concerning the hydrolytic activity of DDAH-2. Therefore, studies on the activity of native DDAH were carried out in eight porcine tissues. Western blot analyses revealed an organ specific expression pattern for both DDAH isoforms in tissues. In thyroid solely DDAH-2 was detected, in contrast in kidney high amounts of DDAH-1 were found. Seven tissues were incubated with ADMA, furthermore thyroid and kidney cytosols were incubated with all DDAH substrates. Again, neither ADMA nor other DDAH substrates were converted to L-citrulline by native DDAH-2 while all substrates were metabolized by tissue DDAH-1.

Taken together, the results with recombinant and native DDAH isoforms are in agreement and clearly indicate that DDAH-2 has no intrinsic hydrolytic activity for methylarginines. Therefore, the postulated metabolism is unsuitable for activity analysis of DDAH-2 and for investigations on isoform selectivity of DDAH inhibitors. The

true physiological function of DDAH-2 and the mechanism of the impact on NO metabolism have now further to be elucidated.