

Asymmetrisches Dimethylarginin als
kardiovaskulärer Risikofaktor:
Transportmechanismen und Auswirkungen
einer Akkumulation

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anita Slenzka
geboren am 05.02.1980 in Ratibor/Polen

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2012

*Diese Arbeit ist den Menschen gewidmet, die ich liebe.
Meiner Mutter, meinem Vater, meinem Bruder und meinem Mann.*

Dank

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Das Endothel – Barriere zwischen Blut und Gewebe.....	1
1.2 NO und Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS)	2
1.2.1 eNOS-Entkopplung.....	4
1.2.2 Endogene eNOS-Hemmer.....	5
1.3 Asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA).....	6
1.3.1 Klinische Relevanz erhöhter ADMA-Plasmaspiegel.....	7
1.4 Humane Transporter für basische Aminosäuren.....	9
Ziel der Arbeit.....	13

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden.....	14
2.1.1 Quantitative real time-PCR (qRT-PCR).....	14
2.1.2 <i>In vitro</i> -Transkription.....	17
2.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	19
2.1.4 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese.....	19
2.1.5 Lösungen.....	20
2.2 Transportstudien an <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	21
2.2.1 Das Expressionssystem der <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	21
2.2.2 Injektion der cRNA.....	23
2.2.3 Transportstudien an <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	24
2.2.4 Lösungen.....	24
2.3 Methoden der Zellkultur.....	27
2.3.1 Färbemethoden.....	27
2.3.2 Auftauen, Einfrieren und Passagieren von Zellen.....	29
2.3.3 Zelllinien.....	30
2.3.3.1 Isolation von primären, humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren (HUVEC).....	31

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl.....	32
2.3.5 Bestimmung des Zellvolumens.....	32
2.3.6 Transfektion.....	34
2.3.7 Transportstudien an Zellen.....	35
2.3.8 Lösungen.....	36
2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
2.4.2 NO-Aktivitätsbestimmung.....	38
2.4.3 High performance liquid chromatography (HPLC).....	41
2.4.4 Lösungen.....	44
2.5 Entwicklung eines Protokolls zur ADMA-Exportmessung an humanen PBMC..	48
2.5.1 Isolation von PBMC (peripheral blood mononuclear cell).....	49
2.5.2 Proteinisolation.....	50
2.5.3 RNA-Isolation.....	50
2.5.4 ADMA- und L-Argininexport an isolierten PBMC.....	51
2.6 Statistik.....	51

3. Ergebnisse

Teil I: *Xenopus laevis*-Oozyten

3.1 Testung individueller Transporter an <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	52
--	----

Teil II: Humane Endothelzellen

3.2 Relative mRNA-Expressionen.....	58
3.3 Exporthemmung durch Entzug von Austauschsubstraten an EA.hy926.....	62
3.4 Exporthemmung durch Entzug von Austauschsubstraten an primären Endothelzellen.....	67
3.5 Exporthemmung durch Herunterregulation des Transporters.....	70
3.5.1 Optimierung der Methode.....	70
3.5.2 Einzelne Herunterregulation der Isoformen γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2.....	77
3.5.3 Simultane Herunterregulation von γ^+ LAT1 und γ^+ LAT2.....	82
3.5.4 Simultane Herunterregulation von γ^+ LAT1 und -2 in primären HUVECs.....	86
3.6 NO-Produktion.....	87

3.6.1 Verifizierung des Radioimmunoassays.....	87
3.6.2 Bedeutung des hCAT-1 für die NO-Produktion.....	91
3.6.3 Einfluss des Natriumentzugs auf die endotheliale NO-Synthase.....	92
3.6.4 Einfluss von intrazellulär akkumuliertem asymmetrischen Dimethylarginin auf die endotheliale NO-Synthase.....	94

Teil III: Humane periphere mononukleäre Blutzellen

3.7 ADMA-Exportmessung an humanen peripheral blood mononuclear cells (PBMC).....	97
3.7.1 Etablierung des Studienprotokolls.....	97
3.7.2 Erste Ergebnisse der Studie.....	104
3.7.2.1 Expression der Endothel-spezifischen Transporter.....	104
3.7.2.2 ADMA- und L-Argininexport aus PBMCs.....	106

4. Diskussion

4.1 Expressionsanalysen zeigen drei mögliche ADMA-Exportproteine und beide Isoformen des ADMA-metabolisierenden Enzyms DDAH in Endothelzellen.....	112
4.2 Exportstudien an <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten zeigen mehrere mögliche ADMA-Exportproteine für Endothelzellen.....	114
4.3 Die intrazelluläre ADMA-Konzentration steigt zeitabhängig bei Entzug von Austauschsubstraten für die Transporter.....	117
4.4 Die intrazelluläre ADMA-Konzentration steigt nach Herunterregulation des Systems γ^+L	118
4.4.1 Die Herunterregulation der einzelnen Isoformen γ^+LAT1 und -2 bestätigt die Dominanz des γ^+LAT2 -Membranproteins in EA.hy926-Zellen	118
4.4.2 Die Herunterregulation des Systems γ^+L hat einen verminderten ADMA-Export zur Folge.....	119
4.4.3 Die Herunterregulation des Systems γ^+L in primären humanen Umbilikalvenenendothelzellen.....	120
4.5 Eine intrazellulär gesteigerte ADMA-Konzentration hat keinen Einfluss auf die Produktion bioaktiven NOs.....	121
4.6 ADMA-Exportmessung an humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).....	125

4.6.1 Methodenkritik an der Messung der Fluss-vermittelten Dilatation (flow-mediated dilation, FMD).....	127
4.6.2 Innerhalb der Studiengruppen existierten keine Expressionsunterschiede der Membrantransporter.....	129
4.6.3 Es existierten drei Ausprägungen der γ ⁺ LAT-vermittelten ADMA-Exportaktivität in humanen PBMCs.....	130
4.6.4 Der Vergleich der Studiengruppen zeigte keine klinisch relevanten Unterschiede im ADMA-Export.....	133
5. Zusammenfassung.....	135
6. Literaturverzeichnis.....	137

1. Einleitung

1.1 Das Endothel – Barriere zwischen Blut und Gewebe

Alle Blutgefäße bestehen aus drei Gewebeschichten unabhängig davon, ob es sich dabei um Arterien oder Venen handelt: die abluminale Seite bildet eine Schicht elastischen Bindegewebes, das Dehnung und Zusammenziehen des Gefäßes erlaubt. Daran schließt sich glatte Muskulatur an und die luminale Seite wird von einem einschichtigen Plattenepithel, dem Endothelium gebildet, welches dem Blutstrom nur einen sehr geringen Widerstand entgegensetzt. Das Endothel besitzt folgende physiologisch wichtige Funktionen:

- es ist als physikalische Barriere für die Regulation des Stoffaustausches zwischen Gewebe und Blut zuständig;
- weiterhin spielt es eine Rolle bei Entzündungsprozessen und Immunreaktionen, indem sich nach lokaler Aktivierung durch verschiedene körpereigene oder mikrobielle Substanzen bestimmte Leukozyten aus dem Blut an das Endothel binden, selbst aktiviert werden und die Immunantwort einleiten (von Andrian, 1991);
- die Steuerung von Vaskularisierungsprozessen normaler und neoplastischer Gewebe und die Sprossung neuer, von bereits vorhandenen Blutgefäßen ausgehenden Gefäßen (Angiogenese) (Ausprunk and Folkman, 1977; Ferrara, 2001);
- Produktion der blutdruckregulierenden Substanz Stickstoffmonoxid (NO), die zur Regulation des Tonus der Gefäßmuskulatur dient, indem das aus dem Endothel in die glatte Muskulatur diffundierende NO die Signalkaskade zur Relaxation startet.

1.2 NO und Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS)

Robert Furchgott entdeckte 1980 den Entspannungsfaktor des Endothels, den er zunächst noch EDRF („endothelium derived relaxing factor“) nannte, bevor Ignarro unabhängig von Furchgott erkannte, dass es sich dabei um Stickstoffmonoxid (NO) handelte (Furchgott and Zawadzki, 1980; Cherry et al., 1982; Ignarro et al., 1987).

NO ist wegen seines ungepaarten Elektrons ein freies Radikal, das giftig und sehr reaktiv ist. Es wird in den unterschiedlichen Geweben von spezifischen Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS-Familie; EC 1.14.13.39) gebildet. Diese oxidieren in den Zellen den Guanidino-Stickstoff des Arginins zu NO, wobei auch Citrullin frei wird (Palmer et al., 1988). Im Einzelnen entsteht bei dieser Reaktion zunächst durch Hydroxylierung das kurzlebige Zwischenprodukt N^G-Hydroxy-L-Arginin. Die hierfür benötigten Elektronen werden von der Reduktasedomäne der NOS durch Oxidation von NADPH bereitgestellt und über die Flavinnukleotide zum Häm-Eisen in der Oxygenasedomäne transportiert (Stuehr et al., 1991). Nach der Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ kann molekularer Sauerstoff bei der anschließenden Oxidierung von Fe²⁺ reduziert werden, indem ein Sauerstoffatom auf das Arginin übertragen und das zweite zu Wasser reduziert wird. Die folgende NADPH-abhängige Oxidation von N^G-Hydroxy-L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und Citrullin benötigt Tetrahydrobiopterin (BH₄) und wiederum molekularen Sauerstoff (Förstermann et al., 1995) (Abb.: A).

Kosubstrate bei dieser Reaktion sind demnach molekularer Sauerstoff und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und als prosthetische Gruppe dienen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMD) und ein Häm-Eisen.

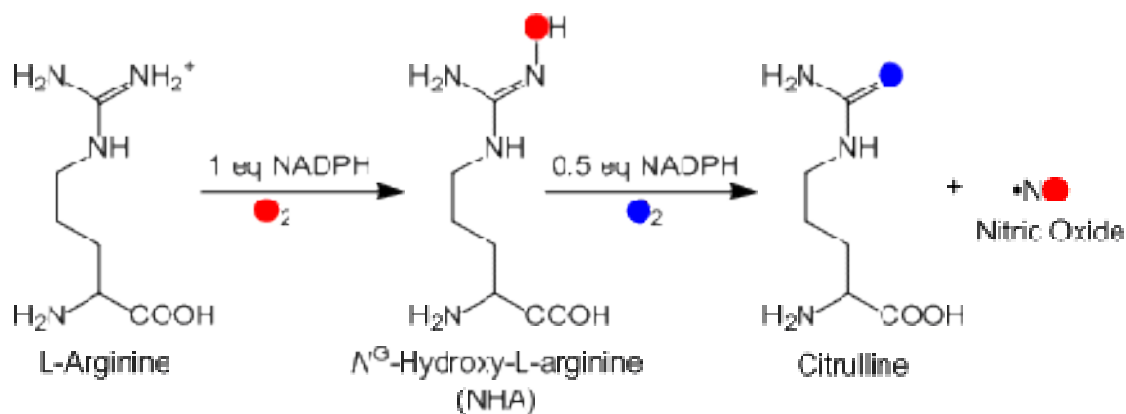


Abb. A: Reaktionsmechanismus der NO-Synthasen. Quelle: <http://www.cchem.berkeley.edu/mmargrp/research/nos/nos.html>

Es sind drei Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS; EC 1.14.13.39) bei Säugern bekannt, die im Folgenden näher erläutert werden (Übersichtsartikel (Förstermann et al., 1994; Dudzinski et al., 2006)):

- Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1)

wurde zuerst aus Cerebellumgewebe der Maus und des Schweins isoliert und charakterisiert und gehört zu den konstitutiv exprimierten NOS-Isoformen. Die nNOS wird in Neuronen und im Skelettmuskel exprimiert und trägt über Neurotransmission zur Zellkommunikation bei. Ihre Aktivität ist Kalzium- und Calmodulin-abhängig.

- Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2),

ist ein high output-Enzym, dessen Aktivität durch eine irreversible Bindung von Calmodulin konstitutiv gehalten wird und die zuerst in Mausmakrophagen entdeckt wurde. Ihre Expression wird durch Cytokine und bakterielles Lipopolysaccharid induziert. Ihre Funktion ist größtenteils Kalzium-unabhängig und wird in den Zellen des Immunsystems bei der Immunabwehr gegen Pathogene benötigt.

- Die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3 oder cNOS)

findet sich in der innersten Zellschicht der Arterien, dem Endothelium und ist Kalzium- und Calmodulinabhängig (Rizzo et al., 1998). Das von der eNOS gebildete, gasförmige NO diffundiert vom Endothelium durch die Gefäßwand in die unterliegenden vaskulären, glatten Muskelzellen und auch ins Gefäßlumen, wo es auf die Thrombozyten wirkt. In den glatten Muskelzellen wirkt es vasodilatatorisch durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase, die zur Bildung des Botenstoffs cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) anregt, was eine Erschlaffung der Muskelzellen und damit eine Vasodilatation zur Folge hat; weiterhin hemmt NO die Anheftung von Leukozyten an die Oberfläche von Endothelzellen und damit die Entstehung von Atherosklerose. In den Thrombozyten hemmt NO deren Aggregation und damit die Bildung von Blutgerinnseln (Radomski, Palmer, and Moncada, 1987). Die beschriebenen positiven Wirkungen in Blutgefäßen machen NO als

gefäßschützenden Faktor aus und weisen darauf hin, dass eine eNOS-abhängige Verringerung der NO-Produktion die Entstehung von Gefäßkrankheiten begünstigen kann.

1.2.1 eNOS-Entkopplung

Für die toxischen Effekte der NO-Synthasen ist von besonderer Bedeutung, dass bei Substratverarmung (Argininkonzentrationen $< 100 \mu\text{M}$) die NADPH-Oxidation teilweise entkoppelt wird (Heinzel et al., 1992). Die intrazelluläre Konzentration an Tetrahydrobiopterin scheint nach Crabtree et al. entscheidend zu sein für die korrekte Funktion der NO-Synthasen (Crabtree et al., 2009): eine eNOS-Entkopplung wird hier ab einem molaren Verhältnis $\text{eNOS}:\text{BH}_4 < 1$ festgestellt. Dabei wird simultan Superoxid (O_2^-) und Stickstoffmonoxid - mit der Möglichkeit einer sofortigen Reaktion zu Peroxynitrit (ONNO-) - produziert (Wever et al., 1997; Xia et al., 1998). Diese Reaktion verläuft 3x schneller als die Disproportionierung des Superoxids durch die Superoxiddismutase (SOD) bei neutralem pH. Peroxynitrit ist wiederum in der Lage, Tetrahydrobiopterin (BH_4) abzubauen, wodurch die eNOS nur noch stärker entkoppelt wird und sich die eNOS von einem gefäßschützenden in ein gefäßschädigendes Enzym wandelt. Man spricht hierbei auch von einer endothelialen Dysfunktion (Förstermann, 2006). Diese eNOS-Entkopplung und die damit verbundene Superoxidbildung sind der Grund dafür, dass eine Erhöhung der eNOS-Expression nicht zwingend zu einer Erhöhung der NO-Produktion im Gefäß führt, da hierfür auch die entsprechende Menge BH_4 zur Verfügung stehen muss. Einem endothelialen BH_4 -Mangel kann grundsätzlich auf zwei Arten begegnet werden: man kann die BH_4 -Bildung erhöhen oder es vor Abbau schützen. Beispielsweise können Statine die Expression des BH_4 -produzierenden Enzyms GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH I) steigern, was in Endothelzellen zu erhöhten BH_4 -Konzentrationen und gesteigerter NO-Produktion durch die eNOS-Funktion führt (Hattori et al., 2003).

1.2.2 Endogene eNOS-Hemmer

Weiterhin können für eine Beeinträchtigung der eNOS-Funktion endogen vorkommende Substanzen verantwortlich sein (Abb.: B): Rees et al. fanden, dass bestimmte L-Argininanaloge die Produktion bioaktiven Stickstoffmonoxids durch das Endothelium *in vitro* und *in vivo* hemmen konnten (Rees et al., 1990). Im Einzelnen handelte es sich dabei u.a. um N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N^G-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME), die konzentrationsabhängig und enantiomerenspezifisch die eNOS-Funktion *in vitro* hemmten. Gleichzeitig konnte *in vivo* eine ebenfalls konzentrationsabhängige Steigerung des systemischen Blutdrucks bei Ratten festgestellt werden, der sich bei Zugabe von L-Arginin als Substrat der eNOS normalisierte.

Auch zwei dimethylierte L-Argininanaloge kommen endogen vor, aber nur eines davon steht im Verdacht, die eNOS-Aktivität zu beeinflussen: das asymmetrische Dimethyl-L-Arginin (ADMA) wird aufgrund von Studien an isolierten NO-Synthasen als kompetitiver NOS-Inhibitor angesehen (Antoniades et al., 2009), wohingegen das symmetrische Dimethyl-L-Arginin (SDMA) keine NOS-hemmende Eigenschaft besitzt. ADMA und SDMA sind mit Konzentrationen von 200 nM – 1 µM die häufigsten in humanem Plasma vorkommenden Methylarginine.

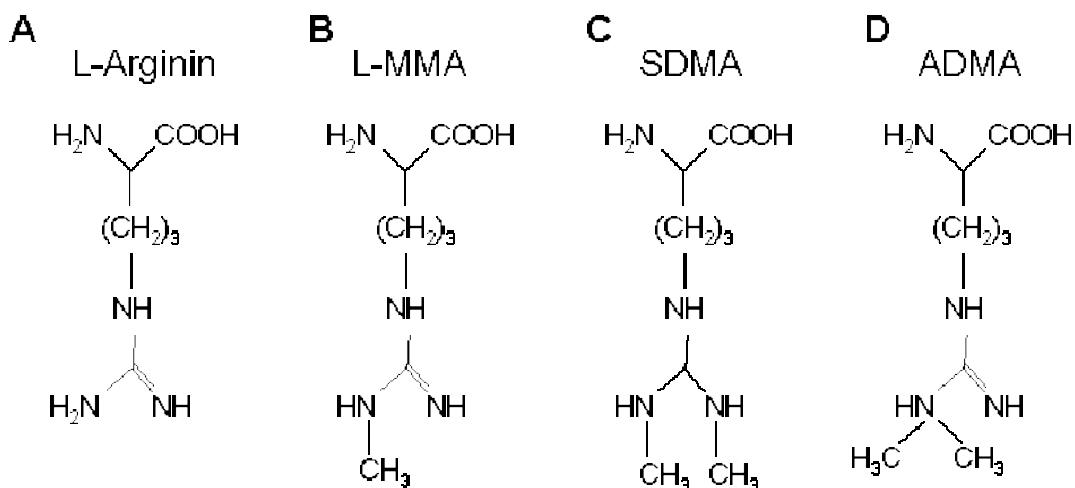


Abb. B: Endogene, methylierte L-Argininanaloge. A: Die essentielle Aminosäure L-Arginin, B: das einfach methylierte N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-MMA), C: das zweifach methylierte L-Argininanalogon symmetrisches Dimethyl-L-Arginin (SDMA), D: der dimethylierte, kompetitive NOS-Hemmer asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA).

1.3 Asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA)

Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA) ist eine endogene, basische Aminosäure, die - vermittelt durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) - durch Dimethylierung von Argininresten in Proteinen entsteht und beim Abbau dieser Proteine durch Proteasen freigesetzt wird. Der Grad an Argininmethylierung der Proteine in der Zelle scheint von verschiedenen Faktoren abhängig zu sein, z.B. der Anwesenheit von nativem oder oxidiertem LDL (oxLDL, low-density lipoprotein) (Böger et al., 2000), der Scherspannung, die die zellulären Bestandteile des Blutes in Gefäßendothelien aufbauen (Osanai et al., 2003) oder auch von oxidativem Stress (Antoniades et al., 2009). Diese Faktoren steigern die Expression und Aktivität der PRMTs und damit die Methylierung von Argininresten intrazellulärer Proteine.

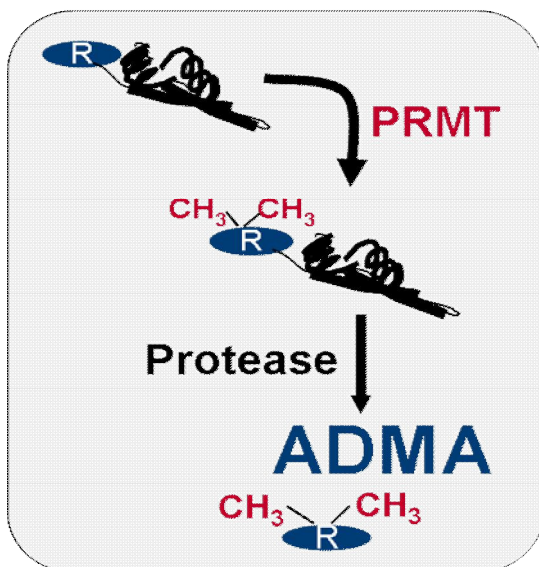


Abb. C: Die Bildung von ADMA in der Zelle. Protein-Arginin-Methyltransferasen übertragen zwei Methylreste auf in Proteinen vorkommende Argininreste. Nach Proteinabbau vermittelt durch Proteasen wird ADMA in der Zelle freigesetzt. ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin; R: Argininrest in einem Protein; PRMT: Protein-Arginin-Methyltransferase;

Zur Elimination wird ADMA entweder ins menschliche Blutplasma transportiert und schließlich renal ausgeschieden oder es kann intrazellulär am Ort seiner Bildung, aber auch in Leber und Niere, durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) gespalten werden, das ADMA zu Citrullin und Dimethylamin metabolisiert und somit aus dem Zytoplasma und damit dem NO-Produktionsort entfernt (Ogawa et al., 1989).

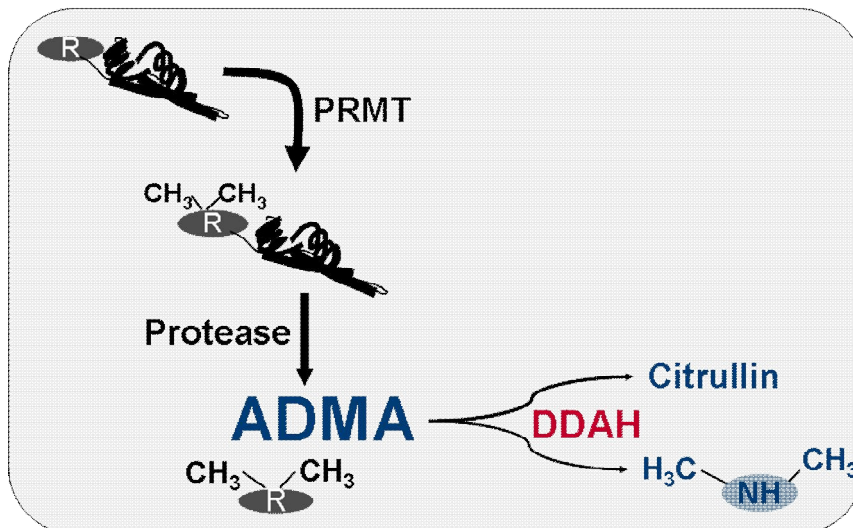


Abb. D: Die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH, rot) metabolisiert ADMA zu Citrullin und Dimethylamin.

Daher könnte eine Hemmung dieses Enzyms den ADMA-Abbau hemmen und die intrazellulär vorkommende ADMA-Konzentration steigern, was sich negativ auf die eNOS auswirken könnte (MacAllister et al., 1996; Ito et al., 1999). Tran und Kollegen fanden über eine Dot Blot-Analyse in 43 adulten und 7 fötalen Geweben, dass die Isoform DDAH1 vorwiegend zusammen mit der neuronalen NOS ko-exprimiert wird, die Expression der Isoform DDAH2 hingegen in hoch vaskularisierten Geweben dominiert (Tran et al., 2000). Beispielsweise finden sich große Mengen DDAH1 im Dünndarm und auch in fötaler Niere; die DDAH2 hingegen findet man in höherer Expression in Milz, Niere, Aorta und Uterus. Auch wurde allgemein eine höhere DDAH2-Expression in fötalen verglichen mit adulten Geweben festgestellt.

1.3.1 Klinische Relevanz erhöhter ADMA-Plasmaspiegel

Erhöhte ADMA-Plasmaspiegel stellen einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar (Böger et al., 1998). In unterschiedlichen klinischen Studien (Tab.: I), beispielsweise bei koronaren Herzkrankheiten (KHK) (Schulze et al., 2006), Atherosklerose (Miyazaki et al., 1999), Bluthochdruck (Gorenflo et al., 2001), aber auch Nierenversagen (Anderstam, Katzarski, and Bergström, 1997) und Präeklampsie (Pettersson et al., 1998), sind die publizierten ADMA-Plasmaspiegel nicht hoch genug um eine ausreichende kompetitive Inhibition der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und damit die Symptome zu erklären. Die Michaelis-Menten-

Konstante (K_m) der eNOS ist 2-4 μM L-Arginin (Förstermann et al., 1994). In seiner Dissertation beschrieb Sandmann (Sandmann, 2000) eine mittlere inhibitorische Konzentration von 1,5 μM ADMA für die isolierte neuronale NOS und 2 μM ADMA für Gewebehomogenate aus Rattenhirn. Die Gruppe um Cardounel (Cardounel et al., 2007) publizierte für die endotheliale NO-Synthase eine K_i von 0,9 μM ADMA. Aus diesen Ergebnissen könnte man schließen, dass eine erhöhte ADMA-Freisetzung eine inhibierende Rolle bei der Produktion bioaktiven NOs innehat. Allerdings sind die publizierten Daten der hemmenden Konzentrationen an isolierten NOS-Enzymen gewonnen worden (bei Cardounel und Sandmann wurde jeweils 100 μM L-Arginin als NOS-Substrat zugesetzt) und die klinischen Daten berücksichtigen nur die ADMA-Konzentrationen im Blutplasma der Patienten. Zudem kann der klinisch relevante ADMA-Plasmaspiegel von 0,5 - 0,7 μM (die Normalkonzentration bei Gesunden liegt bei 0,2 – 0,4 μM) die vorhandenen Symptome nicht durch eine Hemmung der eNOS erklären, da die Konzentrationen des eNOS-Substrates L-Arginin die des ADMAs beständig um zirka das Hundertfache übertreffen (Tab.: I).

Erkrankung	ADMA-Konzentration	L-Arginin-konzentration	Referenz
KHK vs. keine KHK	0.7 μM vs. 0.6 μM		Schulze et al. 2006
Endothelabhängige Lungenarterienrelaxation	0.55 μM vs. 0.21 μM (Kontrollen)		Gorenflo et al., 2001
Niereninsuffizienz	0.7 μM vs. 0.36 μM (Kontrollen)		Anderstam et al., 1987
Präeklampsie	0.55 μM vs. 0.36 μM (Kontrollen)	80,7 μM vs. 74,5 μM	Pettersson et al., 1998

Tab. I: ADMA- und L-Argininkonzentrationen im humanen Plasma. Klinische Studien mit Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen zeigen ähnliche ADMA-Plasmaspiegel.

Im Jahre 2004 wurde ein 37-jähriger, männlicher Patient im Universitätsklinikum Mainz gegen seine gehäuft auftretenden Angina pectoris-Anfälle behandelt. Diese Anfälle traten bis zu 40 Mal pro Tag auf. Er zeigte zudem eine schwere endotheliale Dysfunktion, die einherging mit erhöhter Thrombozytenaggregation und einer ebenso erhöhten und von den Thrombozyten abgeleiteten Superoxidproduktion. Leider sprach der Patient nicht auf konventionelle, vasodilatatorische

Behandlungsmethoden an. Der Zustand des Patienten besserte sich nur durch eine orale Applikation der kationischen Aminosäure L-Arginin, die die endotheliale Dysfunktion ebenso besserte, wie sie die Thrombozytenaggregation und die Superoxidproduktion verminderte. Jedoch wurden nach L-Arginineinnahme ansteigende ADMA-Mengen im Patientenplasma gefunden, was den ersten Hinweis auf eine vorliegende Pathologie der am ADMA-Efflux beteiligten Transporter lieferte. Aufgrund der in vitro gefundenen kompetitiven eNOS-Hemmung (Antoniades et al., 2009) und den Erfahrungen mit dem Angina pectoris-Patienten, ist die Elimination von ADMA aus der Endothelzelle und damit vom NO-Bildungsort von physiologischer Bedeutung. Hierzu muss es einen Transporter in der Membran der Endothelzelle geben, der ADMA aus dieser hinaus in den Blutkreislauf transportieren und den Eliminationswegen zuführen kann.

1.4 Humane Transporter für basische Aminosäuren

Da es sich bei dem hier untersuchten Stoffwechselmetaboliten ADMA um eine kationische Aminosäure handelt, kommen nur Membrantransporter mit basischen Aminosäuren im Substratspektrum für den physiologischen Export aus Endothelzellen in Frage. Im Gegensatz zu dem Membrantransporter, der das Protein meint, steht die ältere Bezeichnung „Transportsystem“ für die Transportaktivität, die mittels radioaktiv markierten Substanzen in Transportstudien gefunden wurde, und daher auf funktioneller Ebene das Substrat und die Natriumabhängigkeit angibt.

Die wichtigsten Eigenschaften der Transport-Systeme für BAS werden im Folgenden vorgestellt:

Das System y^+ wurde in den 60er Jahren von Halvor Christensen entdeckt und charakterisiert (Christensen, 2010; Christensen & Antonioli, 1969). Der Buchstabe y steht für die basische Aminosäure (BAS) Lysin, das erste beschriebene Substrat dieses Transportsystems, $+$ bezeichnet die positive Ladung der Aminosäuresubstrate. Das System y^+ bildet die Familie der human cationic amino acid transporter 1 bis 3 (hCAT-1 bis -3, SLC7A1-3), die basische Aminosäuren natriumunabhängig gegeneinander austauschen (Verrey et al., 2004), was damit in einem energieunabhängigen Prozess resultiert. Es werden auch neutrale Aminosäuren als Substrate der CATs publiziert, die allerdings mit recht geringer

Affinität transportiert werden (Closs and Mann, 1999). Die CATs – bis auf hCAT-2A - sind weiterhin pH-unabhängig und trans-stimulierbar, d.h. dass der Transport zu der Seite mit vorhandenem Substrat erleichtert ist. Der humane CAT-2A bildet eine Ausnahme, indem er pH-Abhängigkeit zeigt und sich weniger sensitiv gegenüber einer trans-Stimulation zeigt. Trotzdem kann beispielsweise der humane CAT-1, der auch in Endothelzellen vorkommt (Closs and Mann, 1999), das nach innen gerichtete Membranpotential zum Nettoimport basischer Aminosäuren in die Zelle hinein nutzen. In den meisten Zellen scheint CAT-1 die vorherrschende Isoform des Systems y^+ zu sein (Verrey et al., 2004). y^+ -Aktivität ist in allen Geweben, mit Ausnahme der Leber zu finden.

Das System y^+L hingegen, das aus den Isoformen y^+LAT-1 (SLC7A7) und y^+LAT-2 (SCL7A6) besteht, stellt eine Gruppe von heteromeren Transportern dar, die zusammen mit dem Glykoprotein 4F2hc (4F2 heavy chain) exprimiert werden müssen, um in die Plasmamembran zu gelangen (Torrents et al., 1998). Das Glykoprotein zählt zur SLC3-Familie. Erstmals wurde die Transportaktivität des Systems y^+L 1992 in humanen Erythrozyten beschrieben (Devés et al., 1992). Der Buchstabe L steht für das Modells substrat Leucin. Die Isoform y^+LAT1 wird vor allem basolateral in der Niere und im Dünndarm exprimiert, was die Symptome der lysinurischen Proteinintoleranz erklärt: ein autosomal rezessiv vererbbarer, genetischer Defekt im Gen, das für y^+LAT1 kodiert, hat eine verminderte Absorption basischer Aminosäuren aus dem Darm und damit eine geringe Plasmakonzentration derselben zur Folge. Für die Produktion von Harnstoff in der Leber fehlen damit die notwendigen Mengen an Arginin und Ornithin und es kommt zur vermehrten Bildung von Ammoniak (Hyperammonämie). Diese Erbkrankheit findet sich mit einer Prävalenz von 1:60000 hauptsächlich in Italien und Finnland. y^+LAT2 hingegen ist die verbreitete Isoform in nicht-epithelialen sowie in epithelialen Geweben (Verrey et al., 2004). Das System stellt eine Gruppe strenger Austauscher mit einer Stöchiometrie von 1:1 dar, die entweder basische Aminosäuren mit hoher Affinität Natrium-unabhängig gegeneinander austauschen oder in einem aktiven Transportmechanismus große neutrale Aminosäuren (NAS) zusammen mit Natrium in das Zellinnere importieren (A. Bröer et al., 2000; Kanai et al., 2000; Pfeiffer et al., 1999; Torrents et al., 1998). Im Gegenzug werden basische Aminosäuren exportiert. Ein weiteres BAS-transportierendes System ist $b^{0,+}$, das basische und neutrale sowie zwitterionische Aminosäuren Na^+ -unabhängig transportiert. Ebenso wie System y^+L

ist $b^{0,+}$ ein Glykoprotein-assoziiertes Carrier, der mit dem Protein rBAT (Genfamilie SLC3) assoziiert ist, um in die Zellmembran zu gelangen (Bauch and Verrey, 2002). Neutrale Aminosäuren sind unter physiologischen Bedingungen weniger affin zum Transporter als basische, d.h. BAS werden aufgrund ihrer höheren Affinität und wegen des Membranpotentials vorzugsweise in die Zelle aufgenommen, wogegen NAS wegen ihrer intrazellulären Akkumulation in Epithelzellen eher heraus transportiert werden (Verrey et al., 2004). System $b^{0,+}$ wurde nach seiner Entdeckung in murinen Blastozysten auch in der Niere, im Dünndarm und in Trophoblasten der Plazenta nachgewiesen (Van Winkle, Campione, and Gorman 1988; Bertran et al., 1992; Furesz, Moe, and Smith, 1991; Verrey et al. 2004).

System $B^{0,+}$ vermittelt als einziges System den Na^+ -abhängigen Transport von BAS, NAS und zwitterionischen Aminosäuren. Da dieser Transporter physiologisch eher die Reabsorption von Aminosäuren in der Niere vermittelt, kann er hier wegen seiner fehlenden physiologischen Bedeutung für das Endothelium des Menschen vernachlässigt werden (Van Winkle, Christensen, and Campione, 1985; Van Winkle and Campione, 1987).

System (Aktivität)	Transportprotein	Na^+-Abhängigkeit	Charakteristische Substrate	System erstmals beschrieben
y^+	CAT-1 (Albritton et al. 1993), CAT-2B (Closs et al. 1997), CAT-3 (Hosokawa et al. 1997; K. Ito 1997)	-	Lys, Arg, Orn	Reticulozyten Fibroblasten (Christensen und Antonioli, 1969)
-	CAT-2A (Closs et al. 1997)	-	Lys, Arg, Orn	Reticulozyten Fibroblasten (Christensen und Antonioli, 1969)
y^+L	y^+LAT1 (Torrents, Estévez, Pineda, Fernández, Lloberas, Shi, Zorzano, and	- (BAS) + (NAS)	Lys, Arg, Orn Leu, Met, Gln	Erythrozyten (Deves et al., 1992)

	Palacín 1998b), y ⁺ LAT2 (Nagase et al. 1996)			
b ^{0,+}	b ^{0,+} AT (Chairoungdua et al. 1999)	-	Lys, Arg, Orn, Leu	Blastozysten (Van Winkle et al., 1988)
B ^{0,+}	ATB ^{0,+} (Kekuda et al. 1997)	+	Lys, Arg, Orn, Ala, Val, BCH	Mausblastozysten (Van Winkle et al., 1985)

Tab. II: Transportsysteme für basische Aminosäuren (BAS). Angegeben sind neben den Transportsystemen und ihrer ersten Entdeckung die Membranproteine mit deren Referenzen, zudem die Natriumabhängigkeit und die Substrate.

Ziel der Arbeit

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile und identifiziert im ersten Teil den physiologisch wichtigen Membrantransporter für endogen gebildetes ADMA. Es wurde dann getestet, ob endogen gebildetes ADMA bei Funktionsverlust des Transporters intrazellulär akkumulieren kann und die Konsequenzen einer intrazellulären ADMA-Erhöhung für die eNOS-Aktivität überprüft.

In Teil II soll für einen translationalen Ansatz ein Protokoll zur Messung des ADMA-Exportes an isolierten, humanen Blutzellen etabliert und erste Schritte zu einer Studie mit Patientenproben in Zusammenarbeit mit der 2. Medizinischen Klinik, Mainz unternommen werden. Diese Studie wird im Rahmen des FMC-Registers Mainz (Bearbeitungsnummer der Ethikkommission 837.401.10 (7410)) durchgeführt und soll die Frage beantworten, ob ein gestörter ADMA-Export mit endothelialer Dysfunktion korreliert. Da hierzu keine Endothelzellen von Patienten zu bekommen sind, werden alternativ die Blutzellen, die aus Überschussmaterial der Blutabnahme gewonnen werden, auf ihren ADMA-Export überprüft. Hierzu wurde ein Protokoll zur Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und eines nachfolgenden ADMA-Exportassays etabliert und auf Replizierbarkeit getestet, weiterhin wurden erste Ergebnisse zur Beantwortung der Fragestellung der Studie gesammelt.

2. Methoden*

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Quantitative real time-PCR (qRT-PCR)

Um RNA mit Hilfe einer quantitativen real time-PCR (qRT-PCR) nachzuweisen, wird sie in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben. Dazu hybridisiert man ein Oligonukleotid an die RNA-Matrize und erstellt durch eine reverse Transkriptase eine cDNA-Kopie. Mittels PCR können dann bestimmte Sequenzbereiche einer DNA millionenfach amplifiziert werden. Dazu werden sequenzspezifische Oligonukleotide benötigt, die die beiden Enden der zu amplifizierenden Bereiche definieren.

Die qRT-PCR ermöglicht eine direkte Detektion von PCR-Produkten durch Fluoreszenzsignale. Aufgrund der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt eine Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Probe erfolgen. Die Detektion kann entweder mit dsDNA-bindenden Fluorochromen (z.B. SYBR GreenI, nicht sequenzspezifisch) oder mit fluorogenen Sonden (z.B. TaqMan Sonden, FRET Sonden oder Molecular Beacons, sequenzspezifisch) erfolgen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TaqMan Sonden, die auch als „dual-labeled probes“ bezeichnet werden, zeichnen sich durch einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende (6-Carboxyfluorescein, FAM) sowie einem „Quencher“-Farbstoff am 3'-Ende (TAMRA) aus. Sind beide Fluoreszenzfarbstoffe an der Sonde gebunden, wird die Reporterfarbstoffemission „gequencht“. Dies geschieht entweder durch die Energieübertragung auf den „Quencher“, der ebenfalls Licht einer bestimmten, aber anderen Wellenlänge emittiert oder aber durch einen sogenannten „Dark-Quencher“, der die erhaltene Energie in Form von Wärme abgibt. Während des Extensionszyklus wird die TaqMan-Sonde aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten. So kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und die Reporterfarbstoffemission

* Teile dieses Abschnitts wurden übernommen aus verschiedenen Diplomarbeiten und Dissertationen, die in der Arbeitsgruppe Closs bereits verfasst wurden.

wird freigesetzt. Das Fluoreszenzsignal kann dann durch die entsprechenden Wellenlängen-spezifischen Filter selektiert und durch eine interne CCD-Kamera aufgezeichnet werden (Abb. E).

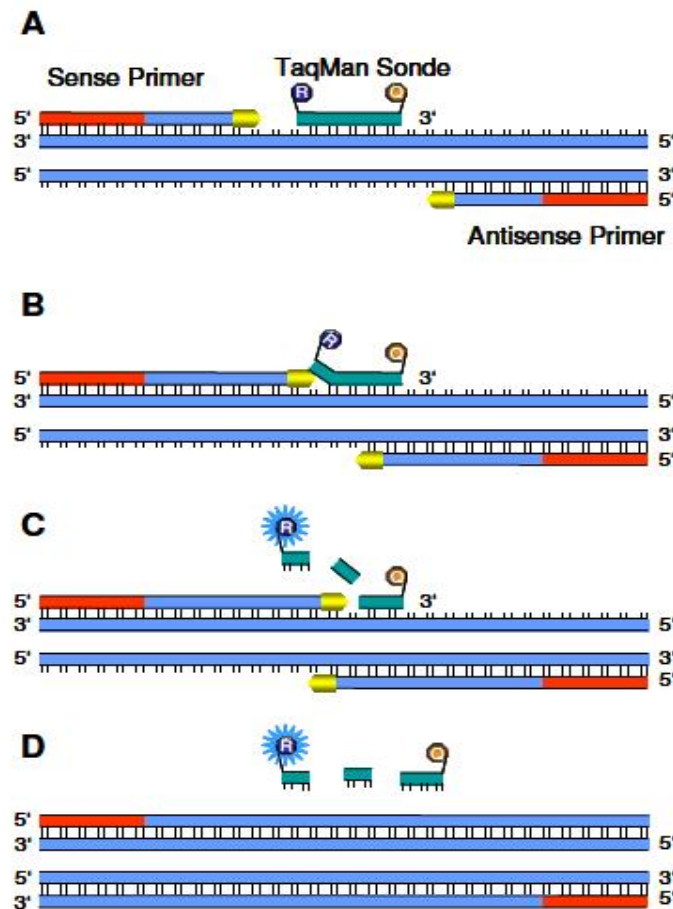


Abb. E: Prinzip von TaqMan-Sonden in einer quantitativen real time-PCR. **A.** Sowohl die Primer als auch die TaqMan-Sonde binden während des „Annealings“ an die Zielsequenz. Die TaqMan-Sonde trägt zwei Fluoreszenz markierte Farbstoffe, einen Reporterfarbstoff (R; FAM) am 5'- und einen Quencherfarbstoff (Q; TAMRA) am 3'-Ende. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Reporterfluoreszenz verhindert. **B.** Während der Extension verlängert die Taq-DNA-Polymerase die Primer und beginnt die Sonde abzulösen. **C.** Die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase spaltet den Reporterfarbstoff von der Sonde ab. **D.** Ist der Reporter einmal vom Quencher getrennt, kann er seine charakteristische Fluoreszenz abstrahlen. (Abbildung aus der Dissertation von A. Simon, 2005)

Die Auswahl der sequenzspezifischen Oligonukleotide sowie der TaqMan-Sonde erfolgte mit Hilfe des Programms „Primer Express“ Version 1.5 (Applied Biosystems). Die optimale Oligonukleotidlänge beträgt 15-20 Basen mit einem G/C-Gehalt zwischen 20 und 70%. Ihr Schmelzpunkt (TM-Wert) soll nicht mehr als 1-2°C unterschiedlich sein und zwischen 58 und 60°C liegen. Die Sonde soll etwa 30 Basen lang sein, mit einem TM-Wert von 10°C über dem der beiden Oligonukleotide. Der G/C-Gehalt soll bei etwa 50% liegen. Die Sonde darf nicht mit den

Oligonukleotiden überlappen oder zu ihnen komplementär sein. Sie darf kein G an ihrem 5'-Ende haben, da diese Base die Reporterfarbstoffemission nach der Abspaltung „quenchen“ würde. Die optimale Amplifikatlänge für eine real-time-PCR liegt zwischen 100 und 150 Basenpaaren. Kürzere PCR-Fragmente amplifizieren effizienter als längere und sind toleranter gegenüber den Reaktionsbedingungen. Beim Oligonukleotid- und TaqMan-Sondendesign ist weiterhin zu beachten, dass das Amplifikat bzw. ein Oligonukleotid über eine Exongrenze hinwegführen sollte, um eine Amplifikation von möglicherweise vorhandener genomischer DNA zu vermeiden. Die One-Step qRT-PCR wurde mit dem QuantiTect RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden) in einem 25 µl Reaktionsvolumen mit 0,1 µg Gesamt-RNA durchgeführt, dNTPs und MgCl₂ wurden zusätzlich hinzugefügt. Die cDNA wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, die wie die TaqMan-Sonden in Tab. V angegeben sind. In Tab. III ist ein Standard-qRT-PCR-Ansatz, in Tab. IV ein Standard-qPCR-Protokoll angegeben.

	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
2 x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12,5 µl	1 x
Sense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Antisense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,8 µM
TaqMan Sonde (10 µM)	1 µl	0,4 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 µl	1,75 mM
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl	je 200 µM
QuantiTect Probe RT Mix	0,25 µl	0,25 µl/Reaktion
Gesamt-RNA	variabel	0,1 µg
RNase-freies Wasser	variabel	
Endvolumen	25 µl	

Tab. III: Standard qRT-PCR-Ansatz

	Anzahl der Wiederholungen	Bemerkung	Dauer des Zyklus	Temperatur
Reverse Transkription	1x	Umschreiben der RNA in cDNA	30 min	50°C
Initialer Aktivierungsschritt	1x	Aktivierung der HotStarTaq-DNA Polymerase, Inaktivierung der RT-Enzyme	15 min	95°C
2-Schritt-Zyklen	50x	Denaturierung	15 sek	94°C
		Annealing/Extension (Temperaturoptimum)	60 sek	60°C

		der Exonukleaseaktivität)		
Ende	1x	Stoppen der Reaktion	∞	4°C

Tab. IV: Standard qRT-PCR-Protokoll für i-Cycler

Gen	Sense Strang (5' -> 3')	Antisense Strang (5' -> 3')	TaqMan Probe (5' -> 3')
hDDAH1	AACGAGGTGC TGAAATCTTG	GCCTTCTGTGC AGATTCACT	6FAM-TGCAACCCATC TGCCACTGG[TAMRA]
hDDAH2	GATGGCACTG ACGTTCTCTT	GTGATTGGTCC ATTTGGAGA	6FAM-GGCCTACGAAA AACTCCCGGC[TAMRA]
hGAPDH	AGCCTCAAGA TCATCAGCAATG	CACGATACCAA AGTTGTCATGGA	6FAM-CTGCACCACCAA CTGCTTAGCACCC[TAMRA]
hy ⁺ LAT1	ATTGTGGCTG CTTCAAGGC	GGTGTGAACCG CTCAACATG	6FAM-CCATCTCCCTGA TGCCATCTGCATG[TAMRA]
hy ⁺ LAT2	CACGTTCACTT ACGCCAAGGT	TCAGAGTGTCC CTGGCACAGT	6FAM-TGCCATCATTGT CATGGGCCTTGTTA[TAMRA]
hCAT-1	CTTCATCACCG GCTGGAACT	GGGTCTGCCTA TCAGCTCGT	6FAM-AATCCTCTCCTAC ATCATCGGTA CTTCAAG CGT[TAMRA]
heNOS	GTGGCTGTCTG CATGGACCT	CCACGATGGTG ACTTTGGCT	6FAM-AGTGGAAATCAAC GTGGCCGTGCTGC[TAMRA]

Tab. V: Oligonukleotide für die qRT-PCR

2.1.2 *In vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription müssen die Plasmide linearisiert vorliegen. Dazu wurden 20 µg Plasmid für 2 Stunden mit 2 µl Restriktionsenzym (Tab. VI) in einem 200 µl-Ansatz inkubiert. Anschließend wurden 10 µl zur Überprüfung der Linearisierung in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und der Rest mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit (Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt.

SLC7-Mitglied	Name des Konstruktes	Enzym zum Linearisieren	Kit zur <i>in vitro</i> Transkription
hCAT-1	pSP64T-hCAT-1	BamH1	SP6
hy ⁺ LAT1	pSGEM-hy ⁺ LAT1	Nhe1	T7
hy ⁺ LAT2	pSGEM-hy ⁺ LAT2	Nhe1	T7
h4F2hc	pGHJSC2-h4F2hc	ACC1	T7

Tab. VI: Plasmidkonstrukte mit den inserierten SCL7-Genen. Sowohl der pSGEM- als auch pSP64T-Vektor enthalten die 3'- und 5'-UTR (untranslatierte Region) des *Xenopus laevis* β -Globin-Gens, sowie einen SP6- und T7-Promotor. Die UTRs tragen zur Stabilität der cRNA in dem Expressionssystem bei.

Die Synthese der *in vitro*-Transkripte erfolgte mit dem mMessage mMachine SP6- bzw. T7-Kit der Firma Ambion. Dieses Kit fügt am 5'-Ende der transkribierten cRNA ein 7'-Methylguanodin-Cap an, so dass die RNA in den Oozyten translatiert werden kann. Zur Durchführung eines Standard-Transkriptionsansatzes wurden die folgenden Reagenzien in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert (Tab. VII):

Reagenz	Menge
2x NTP/CAP-Mix	10 μ l
10x Reaktionspuffer	2 μ l
Linearisiertes Template	1 μ g
Enzymmix	2 μ l
Nuklease-freies Wasser	ad 20 μ l

Tab. VII: Standard-Ansatz einer *in vitro*-Transkription

Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C schloss sich eine 15-minütige Inkubation mit DNase zur Degradierung der eingesetzten Template-DNA an.

Für die Aufreinigung der *in vitro*-Transkripte wurde die RNA durch Zugabe von jeweils 30 μ l Nuklease-freiem Wasser und LiCl-Präzipitationslösung aus dem Kit über Nacht bei -20°C gefällt. Am folgenden Tag wurde die Lösung kurz aufgetaut und für 20 min bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 750 μ l eiskaltem 70% Ethanol folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4°C und 20000 g. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol während einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 20000 g gewaschen. Das Pellet wurde nach Abschütten des Überstandes im Vakuum getrocknet und anschließend in 10 μ l frisch autoklaviertem Aqua bidest. gelöst. 1 μ l der RNA-Lösung wurde anschließend zur photometrischen Konzentrationsbestimmung und zur Überprüfung der Transkription in einer 1%igen Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

2.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung basiert auf der Bestimmung des Absorptionsmaximums der Nukleinsäuren bei 260 nm, für das die aromatischen Basen verantwortlich sind. Nicht gepaarte Basen besitzen allerdings eine höhere Absorption als gepaarte. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde die optische Dichte (OD) der Proben mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Dabei wird Licht durch die in eine Quarzglasküvette gefüllte Probenlösung geleitet und die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Ein OD_{260} -Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm liegt, kann durch die Bestimmung des Verhältnisses der beiden Extinktionen bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung von $> 2,0$. Ein OD_{320} -Wert von > 0 ist ein Hinweis auf in der Probe enthaltenes Phenol.

Formeln zur Berechnung des Nukleinsäuregehaltes:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

2.1.4 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese

Da DNA aufgrund der negativen Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückrats in einem elektrischen Feld zur Anode wandert und die Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Gel von der Porengröße der Gelmatrix abhängt, kann man die Bestandteile eines DNA-Gemisches durch Gelelektrophorese in einem Gel mit definierter Porengröße (Agarosekonzentration) ihrer Größe nach auftrennen. Als Größenstandard wird ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe und Konzentration (DNA-Marker) parallel mit den zu trennenden DNA-Fragmenten aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid können Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden, da dieses zwischen den Basen interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Man muss jedoch

beachten, dass eine korrekte Bestimmung des Molekulargewichts anhand des Laufverhaltens nur bei linearisierten Nukleinsäuren möglich ist, wobei die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum \log_{10} der Anzahl der Basenpaare ist. Besonders gut sieht man Unterschiede im Laufverhalten sequenzidentischer Nukleinsäuren unterschiedlicher Konformation bei superhelikaler ringförmiger, entspiralisierter ringförmiger und linearisierter Plasmid-DNA.

Gelelektrophoresen wurden stets mit 1%igen Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurde 1 g Agarose durch Aufkochen in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst. In das leicht abgekühlte, noch flüssige Gel wurden 20 μ l Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) gegeben, bevor es in eine horizontal orientierte Elektrophoresekammer gegossen wurde. Ein Kunststoffkamm diente als Platzhalter für die Probestaschen. Agarosegele für die Auftrennung von RNA wurden mit RNase-freiem 1x TAE-Puffer hergestellt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 60-90 Volt wurden die Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Anregung des interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.5 Lösungen

50x TAE-Puffer

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

200 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0)

ad 1000 ml Aqua bidest., autoklavieren

1x TAE-Puffer

40 ml 50x TAE-Puffer

ad 2 l Aqua bidest., 1x TAE-Puffer für RNA-Gele mit sterilem Aqua bidest.

2.2 Transportstudien an *Xenopus laevis*-Oozyten

2.2.1 Das Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten

Der Glatte Krallenfrosch (*Xenopus laevis*, auch Afrikanischer Krallenfrosch, Apothekerfrosch) wird systematisch in die Familie der Pipidae (Zungenlose) eingeteilt, die – wie die bekanntere Erdkröte auch - zur Ordnung der Anura (Froschlurche) und zur Klasse der Amphibia (Lurche) gehört. Er kommt in der Natur südlich der Sahara in Afrika vor, wobei er sich aufgrund jahrelanger Verwendung als Labortier und im Zoohandel nun auch in den USA und Europa ausgebreitet hat. Der Krallenfrosch lebt in warmen, meist stehenden Gewässern und kann 15 bis 25 Jahre alt werden. Die vorderen Gliedmaßen besitzen im Gegensatz zu den kräftigen Hinterbeinen keine Schwimmhäute und werden zur Steuerung und zum Beutefang eingesetzt. Die zur Fortbewegung genutzten Hintergliedmaßen tragen an den inneren drei der fünf Zehen kräftige, schwarze Hornkrallen, die das namensgebende Merkmal der Tiere sind. Die Weibchen lassen sich durch ihre 3-lappigen Kloakalpalpen im Genitalbereich, sowie anhand ihrer Größe (ca. 10-13 cm) von den deutlich kleineren Männchen (ca. 8 cm) unterscheiden. Mit ca. 2 Jahren werden die Tiere geschlechtsreif. Aufgrund ihrer Eigenschaft auf das menschliche Hormon Gonadotropin mit Abblanchen zu reagieren, wurden diese Frösche von 1930 bis in die 1960er Jahre hinein für Schwangerschaftstests genutzt, was ihnen den Trivialnamen „Apothekerfrosch“ bescherte. *Xenopus laevis*-Oozyten werden wegen ihrer einfachen Handhabungsmöglichkeiten in der experimentellen Biologie gern als Expressionssystem für Transportproteine, Ionenkanäle oder Rezeptoren eingesetzt. Sie sind verglichen mit anderen Zellen mit etwa 1 mm recht groß und dadurch einzeln behandelbar. Weiterhin sind sie leicht und in großer Anzahl zu gewinnen und haben wegen ihrer hohen Ribosomenanzahl eine starke translationale Aktivität. Morphologisch ist eine schwarzbraun pigmentierte, animale Hemisphäre mit dem Zellkern und Mitochondrien- und Ribosomenreiches Zytoplasma und eine gelbe, vegetative Seite, die die kristallin gepackte Dotterproteine enthält, sichtbar. Dumont (Dumont, 1972) teilte *Xenopus laevis*-Oozyten aufgrund von Parametern wie Durchmesser, Pigmentierung und Dottermenge in 6 Reifestadien ein (Abb. F). Für Expressionsversuche wurden nur Oozyten der Stadien V und VI benutzt.

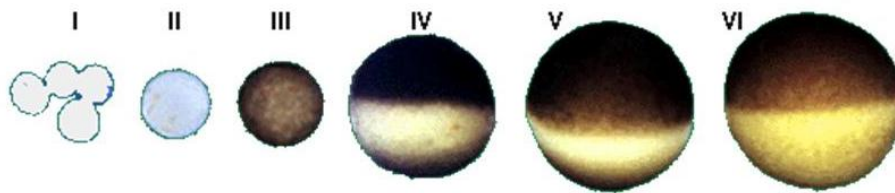


Abb. F: Die Reifestadien der Oozyten von *Xenopus laevis*. Nach Dumont (1972) werden die Oozyten von *Xenopus laevis* in 6 Stadien eingeteilt. Das Bild stammt von der Internetseite <http://www.luc.edu/faculty/wwasser/dev/xenoogen.htm>.

Bei einer Operation zur Gewinnung von Ovarien wurden aufgrund der begrenzten Haltbarkeit der Oozyten nur so viele entnommen wie nötig. Somit konnte jeder Frosch 3-4 Mal operiert werden. Gearbeitet wurde unter keimarmen Bedingungen, also mit sterilen Arbeitsmitteln in einem nicht-sterilen Arbeitsbereich. Ein Frosch wurde betäubt, indem er in eine eiskalte 0,1%ige 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung gesetzt wurde. Nach 30-45 min wurde das Tier mit dem Rücken auf eine Schale mit Eis gelegt. Direkter Hautkontakt mit dem Eis, der zu Verletzungen führen kann, wurde durch Frischhaltefolie und feuchte Tücher vermieden. Einer Austrocknung der Froschhaut wurde ebenfalls durch feuchte Tücher entgegengewirkt, wobei nur der zu operierende Bereich sowie die Atemöffnungen ausgespart wurden. Um keine Gefäße zu verletzen wurde ein ca. 10 mm langer Schnitt durch Ober- und Unterhaut (Fett- und Muskelgewebe) seitlich in der Nähe des Schenkels gesetzt. Durch diese Öffnung wurden die Ovarien mit Hilfe einer Pinzette aus der Bauchhöhle gezogen und mit einer Schere stückchenweise abgeschnitten. Diese Stücke wurden direkt in kaltem Ca^{2+} -haltigen Puffer gewaschen und in Ca^{2+} -haltigem Puffer (+ Gentamycin) bei 4°C gelagert. Beim anschließenden Vernähen der Operationsöffnung wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Muskelgewebe und Oberhaut keine Gewebereste befanden, da dies zu Infektionen und verschlechterter Wundheilung führen kann. Die Unterhaut wurde mit resorbierbaren und die Oberhaut mit nicht-resorbierbaren sterilen chirurgischen Fäden vernäht. Der Frosch wurde unter fließendem lauwarmem Wasser geweckt und für 3-4 Stunden in frisches Wasser gesetzt, das mit einigen Körnern Kaliumpermanganat zur Desinfektion versetzt war. Zur Erholung wurden die frisch operierten Tiere für 3-4 Tage einzeln in einem separaten Becken gehalten, bevor sie wieder zu ihren Artgenossen gesetzt wurden.

Um die Oozyten aus ihrem Verbund zu vereinzeln, wurden sie mit Kollagenase behandelt. Dazu wurden 2-3 ml der Oozytenverbände in ca. 4-6 mm große Stücke

zerschnitten und zirka 8x mit kaltem Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, bis die Lösung nicht mehr trüb war. Dadurch wurden die Oozyten einerseits gereinigt, andererseits wurde so Calcium aus der Lösung entfernt, das sonst die Wirkung der Kollagenase potenziert. Dann wurden 10 ml kalter Ca^{2+} -freier Puffer sowie 100 μl Kollagenaselösung (Stock) hinzugegeben, so dass eine Kollagenasekonzentration von 2 mg/ml gegeben war. Der Oozytenverband wurde 20-40 min leicht geschwenkt, bis der größte Teil der Oozyten sich aus den Verbänden gelöst hatte. Die richtige Dauer des Kollagenaseverdaus war insofern wichtig, da bei zu langer Behandlung die Oozyten stark geschädigt werden. Ist der Verdau zu kurz, löst sich die Follikelhaut um die Eier nicht, was wiederum die Injektion erschwert und die Transportversuche stört. Um die Kollagenase wieder vollständig zu entfernen, wurde zirka 15x mit kaltem Ca^{2+} -freiem Puffer und anschließend 5x mit kaltem Ca^{2+} -haltigen Puffer gewaschen. Die Oozyten wurden anschließend in eine Petrischale überführt und in Ca^{2+} -haltigem Puffer mit ca. 2% FCS inkubiert, um die Restaktivität der Kollagenase zu blockieren. Beschädigte Oozyten und Restverbände wurden sofort aussortiert. Nach 2-3 Stunden wurde die FCS-haltige Lösung durch Ca^{2+} -haltigen Puffer (+ Gentamycin) ersetzt.

Gelagert wurden die Oozyten in Ca^{2+} -haltigem Puffer + Gentamycin oder in Kulturmedium bei 4°C. Zur Pflege der Oozyten wurden täglich beschädigte oder degenerierende Oozyten aussortiert und das Lagerungsmedium erneuert.

2.2.2 Injektion der cRNA

Bei der Injektion wurde mit Handschuhen gearbeitet, um eine weitgehend RNase-freie Arbeitsumgebung zu schaffen. Die zu injizierenden RNA-Lösungen wurden mit autoklaviertem, sterilfiltriertem Aqua bidest. auf die gewünschte Konzentration verdünnt. In einer Petrischale wurde ein Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 1000 x 1000 μm mit Ca^{2+} -haltigem Puffer überschichtet. Auf dieses wurden ausgewählte Oozyten der Stadien V und VI ohne Follikelhäutchen mit einer Pasteurpipette positioniert.

Mikrokapillaren wurden mit einem Kapillarziehgerät hergestellt und mit 2-5 μl der jeweiligen cRNA-Lösung befüllt. Durch einen Mikroinjektor wurde ein definiertes Volumen (z.B. 35 nl) pro Oozyte injiziert. Das Volumen wurde anhand der

Tröpfchengröße gemessen und über die Öffnungsgröße der Mikrokapillare und die Dauer des Ausstoßintervalls eingestellt. Die Kapillaröffnung wurde durch schrittweises Abknipsen der Spitze vergrößert bis die gewünschte Tröpfchengröße erreicht war. Die Injektionsdauer wurde möglichst zwischen 4,5 und 5,5 Sekunden gewählt, so dass die Größe der injektionsbedingten Verletzung bei allen Versuchen möglichst ähnlich war. Um Verletzungen des im animalen Pol liegenden Zellkerns zu vermeiden, wurde die Kapillare stets in den vegetativen Pol eingestochen. Die Oozyten wurden in Gentamycin-haltigem Kulturmedium bei 16-18°C für 48 Stunden in Petrischalen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden mit Wasser injizierte Oozyten verwendet, die den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt waren wie die injizierten. Da sich zeigte, dass nicht injizierte Oozyten die gleichen Eigenschaften aufwiesen wie Wasser-injizierte, wurden z.T. auch nicht injizierte Oozyten als Kontrollen mitgeführt.

2.2.3 Transportstudien an *Xenopus laevis*-Oozyten

Nach zweitägiger Inkubation bei 16-18°C wurden die Oozyten 3x in kaltem Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und 4-6 h darin depletiert. Es wurden 35 nl des mutmaßlichen Transportersubstrates (0,1 M) auf Eis injiziert. Danach wurden jeweils 3 Oozyten zusammen 30 min lang im 20°C-Wasserbad in 200 µl des jeweiligen 1 mM *trans*-Stimulators, der in Na⁺-Aufnahmepuffer gelöst wurde, inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Transportersubstrat in nicht-exprimierende Oozyten injiziert. Nach Ablauf der Transportzeit wurden 150 µl des Überstandes per HPLC auf die Menge des exportierten Substrats analysiert.

2.2.4 Lösungen

1x Ca²⁺-freier Puffer

	Endkonzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM

HEPES 5 mM
in Aqua bidest.

1x Ca²⁺-haltiger Puffer

Endkonzentration

1x Ca²⁺-freier Puffer

CaCl 1,8 mM

Kollagenaselösung

Endkonzentration

Kollagenase A

200 mg/ml

in Aqua bidest.

Gentamycinlösung

Endkonzentration

Gentamycin

50 mg/ml

in Aqua bidest.

Lagerungspuffer

500 ml 1x Ca²⁺-freier Puffer

1 ml Gentamycinlösung

Oozytenkulturmedium

15 ml Leibovitz L-15-Medium

750 µl 1 M HEPES (pH 7,6)

100 µl Gentamycinlösung

ad 50 ml steriles Aqua bidest.

1x Na⁺-Aufnahmepuffer

Endkonzentration

KCl 2 mM

MgCl₂ 1 mM

CaCl₂ 1 mM

~ Methoden ~

NaCl	0,1 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	5 mM
HEPES (pH 7,6)	5 mM
in Aqua bidest.	

2.3 Methoden der Zellkultur

2.3.1 Färbemethoden

- 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Test auf Mykoplasmen

4',6-Diamidino-2-phenylindol (kurz DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Mikroskopie zur Erkennung von Zellkernen eingesetzt wird. Er interkaliert mit der DNA und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht (Absorptionsmaximum 358 nm) im sichtbaren Bereich bläulich (Emissionsmaximum 461 nm).

Zur Bestimmung der Abwesenheit von Mykoplasmen in einer Zellkultur müssen die Zellen mindestens 4 Passagen ohne Antibiotika kultiviert werden, bevor sie dünn auf einer 5 cm-Petrischale ausgesät und mit 1 ml eines kalten Methanol:Eisessig-Gemisches (3:1, - 20° C) fixiert wurden. Dieses wurde nach 1 min verworfen und die Zellen an der Luft getrocknet. Auf die trockenen, fixierten Zellen wurde nun 1 ml DAPI-Lösung (1:1000 in PBS) gegeben und die Petrischale bei RT im Dunkeln 5 min inkubiert. Hiernach musste die restliche DAPI-Lösung mit Wasser gut abgewaschen werden und der Farbstoff konnte im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 461 nm sichtbar gemacht werden. Der Test auf Mykoplasmen ist negativ wenn nur wenige große Zellkerne auf der Platte erkennbar sind, die nur die Anwesenheit der kultivierten Zellen bezeugen; positiv dagegen wenn sich auch viele weitere, kleinere Zellkerne finden, die den Mykoplasmen zugeordnet werden müssen.

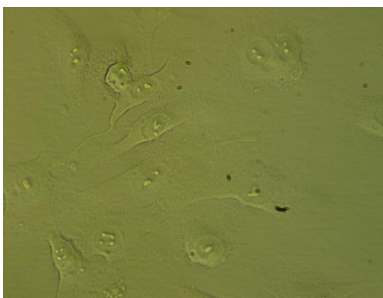


Abb. G: EA.hy926-Zellen im Hellfeld bei 30-facher Vergrößerung und 5 sek Belichtungszeit

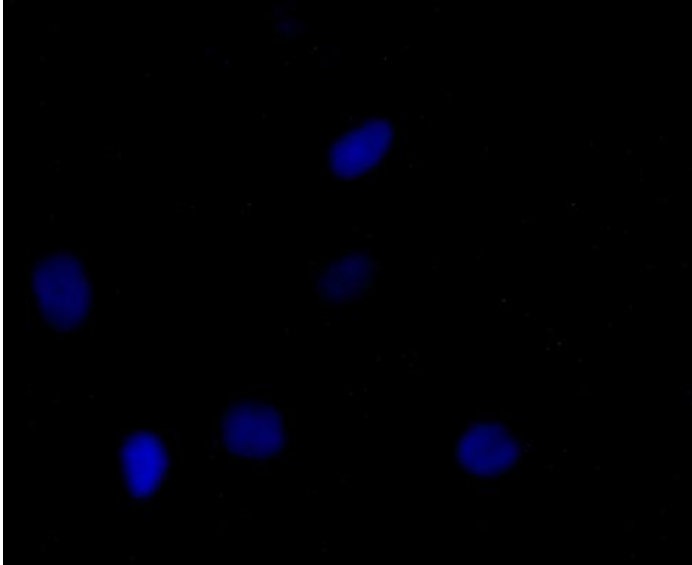


Abb. H: EA.hy926-Zellen aus der Hellfeld-Abbildung unter UV-Licht bei 30-facher Vergrößerung und 5 sek Belichtungszeit. Ein Beispiel für Mykoplasmen-freie Zellen.

- Trypanblaufärbung zur Differenzierung vitaler von nicht vitalen Zellen

Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch Trypanblaufärbung. Es handelt dabei um einen Farbausschluss-Test: da Trypanblau einen sauren Farbstoff darstellt, ist eine intakte Zellmembran für die Zelle nötig, um das Verbleiben des Farbstoffs in der Zelle zu verhindern, indem sie diesen aktiv wieder ins Extrazellulärmedium heraus transportiert. Tote Zellen können diesen aktiven Auswärtstransport nicht mehr bewerkstelligen, der Farbstoff verbleibt in der Zelle und kann als Anion an zytosolische Proteine binden und das Zytoplasma blau färben.

Um den Anteil an toten Zellen nach Inkubation in Locke's Lösung ohne Natrium zu bestimmen, wurden EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten unterschiedlichen Inkubationszeiten ausgesetzt. Die Zellen wurden mit eiskalter LL ohne Natrium gewaschen, 30 min in derselben Lösung depletiert und schließlich für die angegebenen Zeiträume bei 37° C in LL ohne Natrium oder LL mit Natrium inkubiert. Die Zellen der Positivkontrolle wurden in ihrem Zellkulturmedium belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Extrazellulärpuffer verworfen und die Zellen mit je 200 µl 0,18%ige Trypanblaulösung in LL ohne oder mit Natrium pro Loch versetzt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden vorher mit je 200 µl 70 %-igem Ethanol getötet und gleichzeitig fixiert. Nach 1-2 min Einwirkzeit konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

2.3.2 Auftauen, Einfrieren und Passagieren von Zellen

- Auftauen

Zu lagernde Zellen werden in 1 ml-Aliquots in einem Stickstofftank aufbewahrt. Bei Bedarf wurde ein Aliquot entnommen und schnellstmöglich aufgetaut. Der Inhalt mit der Zellsuspension wurde in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums überführt und 5 min bei 900 g und RT abzentrifugiert, um das für die Zellen schädliche Dimethylsulfoxid zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche (im Falle primärer Zellen oder HUVECs in eine T25-Zellkulturflasche) überführt. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um letzte Reste des Dimethylsulfoxids und tote Zellen zu entfernen.

- Einfrieren

Konfluenten Zellen in einer T75-Zellkulturflasche wurde einen Tag vor der Einfrierprozedur frisches Medium angeboten. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x mit DPBS gewaschen und 1 ml Trypsin zugefügt, welches man durch Schwenken der Flasche über die Zellen verteilte und überschüssiges Trypsin sofort wieder absaugte. Nun wurden die Zellen 3 min im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurde das Einfriermedium vorbereitet: für empfindliche Zellen (primäre Zellen oder HUVECs) wurden 3 ml FCS mit 10% Dimethylsulfoxid, für alle anderen Zellen das entsprechende FCS-haltige Kulturmedium mit 10% Dimethylsulfoxid versehen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Kulturmedium durch Auf- und Abpipettieren vom Flaschenboden gelöst und in ein Schraubdeckelgefäß aus Plastik überführt, das 5 min bei RT und 900 g zentrifugiert wurde, um das Kulturmedium zu entfernen. Dieses wurde verworfen, das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension in Kryovials aliquotiert. Die Kryovials wurden zunächst einen Tag lang bei -80°C und dann im Stickstofftank bei gelagert, damit sich die Lagerungstemperatur von -196°C langsam einstellen konnte.

- Passagieren/Splitten

Die Zellen in einer Zellkultur müssen regelmäßig vereinzelt werden, da zu dichtes Wachstum ihnen schadet. Je nach Zelllinie muss dieses Splitten oder Passagieren genannte Verfahren bei konfluenten (dichteren) oder weniger konfluenten Zellen (80 – 90 % bei primären Zellen) durchgeführt werden. Den Zellen wurde hierfür einen Tag vor dem Passagieren frisches Medium angeboten. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1-3x mit DPBS gewaschen und 1 ml Trypsin zugefügt, welches man durch Schwenken der Flasche über die Zellen verteilt und überschüssiges Trypsin sofort wieder absaugte. Nun wurden die Zellen 3 min im Brutschrank inkubiert, bevor sie mit 10 ml Kulturmedium durch Auf- und Abpipettieren vom Flaschenboden gelöst und nur ein Teil der Zellen in die Flasche zurück gegeben wurde (z.B. bei 1:10-Splitten wurde 1 ml der 10 ml Zellsuspension in die Flasche gegeben). Das fehlende Volumen wurde durch Zugabe frischen Kulturmediums aufgefüllt und die Zellkulturflasche zurück in den Brutschrank gestellt.

2.3.3 Zelllinien

- EA.hy926-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die durch Fusion humaner Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) mit Zellen einer humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzelllinie A549/8 gewonnen und uns freundlicherweise von Cora-Jean S. Edgell von der University of North Carolina at Chapel Hill, USA zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zellen exprimieren endogen die humanen Aminosäuretransporter hCAT-1 und das System γ^+ LAT, außerdem die endotheliale NO-Synthase (Edgell, McDonald, and Graham, 1983).

- HCAEC

Primäre humane Endothelzellen der Koronararterie (human coronary artery endothelial cell) wurden käuflich von Promocell, Heidelberg erworben. Sie wurden in

Endothelial Cell Growth Medium von Promocell (Heidelberg) kultiviert, bei 80%iger Konfluenz passagiert und bis Passage 6 verwendet.

- HCMEC

Ebenfalls wurden die primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen des Herzens (human cardiac microvascular endothelial cell) käuflich von Promocell, Heidelberg erworben. Sie wurden in Endothelial Cell Growth Medium von Promocell (Heidelberg) kultiviert, bei 80%iger Konfluenz passagiert und bis Passage 5 verwendet.

- RFL-6

RFL-6 sind Fibroblasten aus fötalen Rattenlungen. Sie verfügen über eine gut stimulierbare lösliche Guanylatcyclase, haben jedoch keine endogene NO-Synthase. Deshalb wurden sie als Reporterzellen zur Messung der NO-Aktivität von endothelialen Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden von ATCC (CCL-192) bezogen. RFL-6 Zellen wachsen in Ham's F-12 Medium mit 15% FCS (Hay, Williams, Macy, and Lavappa, 1982). Wichtig bei der Passagierung dieser Zellen ist, dass man vor Trypsinzugabe das FCS aus dem Medium gut abwäscht, ansonsten sind diese Zellen schwer vereinzelbar und klumpen leicht, was in der NO-Produktionsmessung zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Daher wurden die Zellen vor dem Splitten 3x gut gewaschen.

2.3.3.1 Isolation von primären, humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren (HUVEC)

Die Isolation von human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) geschah halbsteril unter der Sterilbank. Hierzu wurde die Nabelschnur zunächst mit Papiertüchern trocken getupft und ihre Enden mit einem Skalpell dekaptiert. Nun wurde an einem Ende der Nabelschnur die Umbilikalvene – die größte der drei sichtbaren Gefäße – mit einer abgerundeten Pinzette geweitet und eine Kanüle mit Drei-Wege-Hahn eingeführt, an den eine mit DPBS gefüllte Einmalspritze adaptierte. Die

Umbilikalvene wurde solange mit DPBS gespült, bis kein Blut mehr austrat. Erst dann konnte mit dem anderen Ende der Nabelschnur genauso verfahren werden: die Umbilikalvene konnte mit der abgerundeten Pinzette geweitet und die Kanüle mit Drei-Wege-Hahn und Einmalspritze eingeführt werden. Nun wurde die Umbilikalvene mit Liberaselösung (~ 5 Wünsch units/ml Kulturmedium ohne FCS) befüllt, beide Drei-Wege-Hähne geschlossen und die Spritzen entfernt. Vor dem Eintauchen in 37°C warmes DPBS wurde die Nabelschnur mit Liberaselösung noch massiert, bevor sie 10 min in 37° C temperiertem DPBS inkubierte.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Liberaselösung mit den HUVECs in 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen und die Umbilikalvene nochmals solange mit DPBS befüllt, massiert und das DPBS im Zentrifugenröhrchen aufgefangen bis es voll war, um die HUVEC-Ausbeute zu maximieren. Danach wurden die Zellen 15 min bei 900 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand mit der Liberase abgesaugt, die HUVECs in Endothelial Cell Growth Medium von Promocell (Heidelberg) resuspendiert und in eine mit 1% Gelatine beschichtete T25-Zellkulturflasche gegeben (auch alle weiteren Plastikwaren, die für HUVECs verwendet wurden, mussten ebenso mit 1% Gelatine in DPBS beschichtet werden). Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um die letzten Reste der Liberase und unerwünschte Zellen zu entfernen. Die HUVECs wurden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert, immer nur 1:2 passagiert und in der 3. Passage für Experimente verwendet.

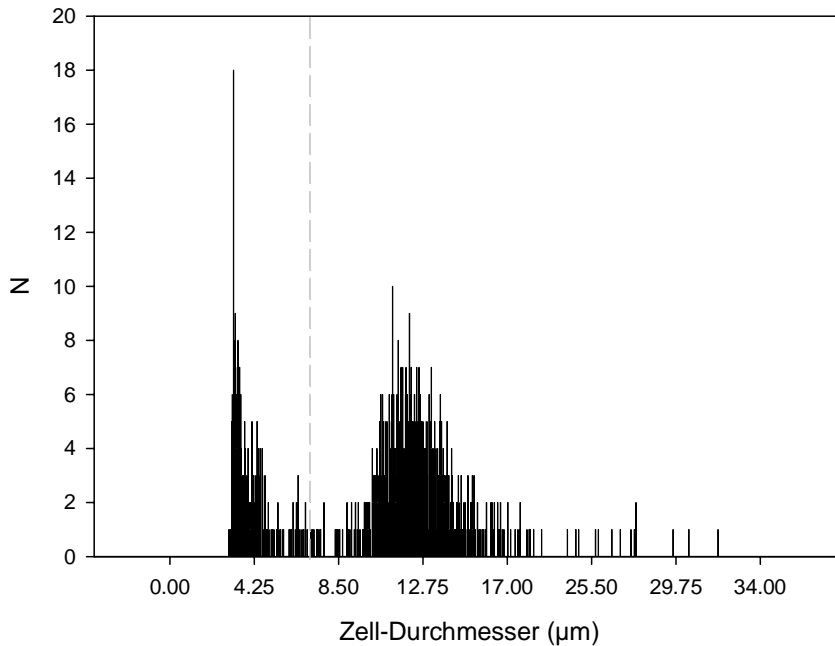
2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Um eine definierte Anzahl an Zellen aussäen zu können, wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl pro ml errechnete sich aus dem Mittelwert der Zellen jedes der 4 Großquadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und der Kammerkonstanten 10⁴.

2.3.5 Bestimmung des Zellvolumens

Zur Bestimmung des Zellvolumens, welches für die Berechnung der Aminosäurekonzentrationen von Bedeutung ist, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Kempfski vom Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie ein Casy 1-

Schärfesystem mit ähnlicher Funktion wie ein Coulter-Counter genutzt. Dieses bestimmt das Volumen einer Zelle in Suspension, indem es einzelne Zellen durch eine definierte Öffnung saugt und die Widerstandsänderung misst, die die Zelle beim Durchtritt durch die Öffnung auslöst. Unten ist ein repräsentativer Graph gezeigt, der den Zelldurchmesser gegen die Anzahl der Zellen aufträgt. Das Zellvolumen kann aus den Angaben darunter ersehen werden.



Date 08/17/2011
Time 09:21:00

Calibration File K000_030.150

Capillary (µm) 150

Scale from (µm) 0

Scale to (µm) 30

Number of repetitions 1

Sample volume (µl) 400

Total counts 687

Dilution 1

Counts below scale 0

Counts above scale 5

Left cursor (µm) 7.0000e+00

Right cursor (µm) 3.0000e+01

Counts of repetition # 1 686

Counts/ml 1.7175e+03

Total Volume/ml (fl) 2.2058e+06

Mean Volume (fl) 1.2843e+03

Std.Dev. of Mean Volume 1.0577e+03

Error of Mean Volume 4.0353e+01

Median Volume (fl) 1.3582e+03

Mean Diameter (µm) 1.2950e+01

Std.Dev. of Mean Diameter 2.5049e+00

Error of Mean Diameter 9.5567e-02

Median Diameter (µm) 1.2583e+01

Maximum (µm) 1.1587e+01

Volume at Maximum (fl) 8.1452e+02

Sigma 1 5.8594e-02

Sigma 2 2.9297e-02

2.3.6 Transfektion

Um eine verringerte Expression bestimmter Gene zu erreichen, wurde siRNA (small interfering RNA) mittels käuflich erworbener Transfektionsmittel in die Zellen eingebracht. siRNAs sind 21-23 Basenpaare lange, doppelsträngige Ribonukleinsäuren, die natürlich in Zellen vorkommen und dort eine Rolle beim posttranskriptionalen Gensilencing spielen. Transfektionsmittel sind das chemisch hergestellte Medium, mit dem die siRNA durch die Membran in die Zellen hinein gelangt. Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die siRNA durch die Membran in das Zellinnere zu bringen: Transfektionsmittel können auf Nanopartikeltechnologie, auf Lipiden, Polymeren oder PEG-Liposomen beruhen. Wichtig ist hierbei einzig, dass die siRNA gut vom Transfektionsmittel komplexiert wird und dass dieser Komplex effektiv durch die Zellmembran gelangen kann. In der Zelle wird die siRNA ein Teil des RNA-induced silencing complex (RISC), der die Ziel-mRNA abbaut und damit die Translation des Zielgens unterbindet. Dieses Verfahren hilft dabei, die Funktion einzelner Gene besser zu verstehen.

Transfiziert wurde in 6 Loch-Platten, die am Vortag mit 300000 Zellen pro Loch besät wurden. Zunächst wurde siRNA und Saint-Red (aus dem Transfektionskit von Synvolux, Groningen, NL) auf die jeweils gewünschten Konzentrationen mit dem beigefügten Verdünnungsmedium HBS verdünnt, dann vereinigt und gut gevortext (Tab. IX). Dieses Gemisch wurde 5 min bei RT inkubiert, damit sich die Transformationskomplexe bilden konnten. Dann wurde je nach Anzahl der zu transfizierenden Löcher für jedes 225 µl Transformationsmix mit 675 µl Kulturmedium ohne FCS gemischt und dieses nach 3-maligem Waschen der Zellen mit je 1 ml DPBS auf die Zellen geträufelt. Die Platte wurde 3 h im Brutschrank inkubiert und die Transfektion nach Ablauf dieser Zeit gestoppt, indem die Löcher abgesaugt und mit je 2 ml frischem Medium mit FCS befüllt wurden.

siRNA gegen	Zielsequenz	Sense Strang (5' -> 3')	Antisense Strang (5' -> 3')
hy ⁺ LAT1	TAGAGAGACAT GAAACTATCA	GAGAGACAUGAA ACUAUCA	UGAUAGUUUCAUG UCUCUC
hy ⁺ LAT2	CAGGATCTGGG CCAACCTCAA	GGAUCUGGGCAA ACCUCAA	UUGAGGUUGGCC CAGAUC

Tab. VIII: Oligonukleotide für die Transfektion.

für 1 Loch einer 6 Loch-Platte	siRNA	Saint-Red
56 nM (γ^+ LAT2)	2,52 μ l (stock 20 μ M) mit 53,73 μ l HBS verdünnen	20 μ l mit 36,25 μ l HBS verdünnen
56 nM (γ^+ LAT1)	2,52 μ l (stock 20 μ M) mit 53,73 μ l HBS verdünnen	20 μ l mit 36,25 μ l HBS verdünnen
112 nM non target	5,04 μ l (stock 20 μ M) mit 107,46 μ l HBS verdünnen	20 μ l mit 92,5 μ l HBS verdünnen

Tab. IX: Verdünnungsschema für den Transformationskomplex für ein Loch einer 6 Loch-Platte.

2.3.7 Transportstudien an Zellen

- radioaktiver Import

Die Zellen wurden in 96-Lochplatten mit einer Dichte von 25000 Zellen pro 100 μ l ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x mit eiskalter Locke's Lösung (LL+Na⁺) gewaschen und eventuell 15 min mit 200 μ M N-Ethylmaleimid (NEM) bei 37°C vorinkubiert. Nun pipettierte man zügig mit der Mehrkanalpipette eine auf 37° C vorgewärmte LL+Na⁺ mit 10 μ M Arginin und 5 μ Ci/ml [³H]-L-Arginin. Wo angegeben, enthielt die Lösung zusätzlich 1 mM L-Leucin. Nach 30 sek kompetitivem Argininimport bei 37° C in die Zellen wurde die Transportlösung aus der 96 Loch-Platte ausgeschlagen und die Platte 3x durch Eintauchen in eiskalte LL+Na⁺ gewaschen. Es folgte eine zügige Zugabe von je 50 μ l 0,5 N NaOH und eine vollständige Lyse der Zellen durch 30 min taumeln bei RT. Zum Ausgleichen des pH-Werts wurden nochmals je 50 μ l 0,5 N HCl zugegeben und zur Vergrößerung des Volumens je 50 μ l Puffer P. Dann konnten je 100 μ l des Zelllysats nach Zugabe von je 2 ml Szintillationsflüssigkeit (LumaSafe Plus, Perkin Elmer, Rodgau) im β -Zähler auf die transportierte Menge an Radioaktivität analysiert und 25 μ l Zelllysats zur Proteinbestimmung benutzt werden.

- Exportmessung

Da weder hCAT-1 noch das System γ^+ LAT ihre Transportaktivität ohne kationische (hCAT-1) oder große neutrale Aminosäuren und Natriumionen (γ^+ LAT) im Außenmedium ausüben können, wurden sämtliche Versuche zur ADMA-Akkumulation an Zellen durchgeführt, indem man diese in 6 Loch-Platten 5x mit je 2 ml eiskalter Locke's Lösung ohne Natrium (LL- Na^+) wusch und dann mit derselben Lösung bei 37° C inkubierte. In den ersten 30 min des Versuches wurde dieses Medium alle 10 min gewechselt, dann nur noch alle 30 min oder nicht mehr. Falls eine Analyse des Exports gewünscht war, wurde in den letzten 5 min des Versuchs die LL- Na^+ gegen eine LL+ Na^+ und 1 mM einer Aminosäure, die ein *trans*-Stimulator für den Export darstellt, ausgetauscht und die Zellen bei 37° C inkubiert. Zum Abstoppen des Versuches wurde die Platte in Eiswasser gestellt und das Außenmedium abgenommen, die Zellen 2x mit je 1 ml eiskalter LL- Na^+ gewaschen und mit je 300 μl 70%igem Ethanol lysiert. Die Überstände und Lysate wurden nach Aufarbeitung und Derivatisierung mit OPA (Orthophthaldialdehyd) per HPLC auf die Menge der basischen Aminosäuren analysiert.

2.3.8 Lösungen

Puffer P

	Endkonzentration
5 ml 1 M Tris/HCl pH 7,4	50 mM
0,1 ml 0,5 M EDTA	0,5 mM
0,1 ml 0,5 M EGTA	0,5 mM
ad 100 ml Aqua bidest.	

10x Locke's Lösung mit Natrium (LL+ Na^+)

	Endkonzentration
90 g NaCl	154 mM
4,18 g KCl	5,6 mM
2,03 g MgCl_2	1 mM
23,83 g HEPES	10 mM

3,02 g NaHCO₃ 3,6 mM

ad 1 l Aqua bidest., mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren;

vor Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen und pro ml Locke's Lösung 2 µl 1 M CaCl₂ (Endkonzentration 2 mM) und 5,6 µl steril filtrierte 1 M Glucose (Endkonzentration 5,5 mM) zugeben

10x Locke's Lösung ohne Natrium (LL-Na⁺)

	Endkonzentration
52,06 g Cholinchlorid	157,6 mM
836 mg KCl	5,6 mM
406 mg MgCl ₂	1 mM
23,83 g HEPES	10 mM

ad 200 ml Aqua bidest., mit KOH auf pH 7,4 einstellen;

vor Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen und pro ml Locke's Lösung 2 µl 1 M CaCl₂ (Endkonzentration 2 mM) und 5,6 µl steril filtrierte 1 M Glucose (Endkonzentration 5,5 mM) zugeben

Glucose

	Endkonzentration
9,9 g Glucose	1 M

ad 50 ml entmin. Wasser, steril filtrieren, bei 4-8°C lagerfähig

0,5 % Trypanblaulösung:

0,5 g Trypanblau

ad 100 ml entmin. Wasser, bei RT einige Monate lagerfähig

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zelllysate bestehen aus komplexen Gemischen verschiedenster Verbindungen und Proteine. Letztere werden häufig mit Hilfe von Farbreaktionen funktioneller Gruppen mit farbstoffbildenden Reagenzien quantitativ nachgewiesen. Die Intensität des Farbstoffes korreliert dabei mit der Konzentration der reagierenden Gruppen im Protein und kann photometrisch exakt gemessen werden. Zur Proteinbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay-Kit von Thermo Scientific (Schwerte) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Test, bei dem zunächst in alkalischen Medium Kupferionen (Cu^{2+} wird reduziert zu Cu^+) mit Peptiden, die 3 oder mehr Aminosäurereste besitzen, einen hellblauen Chelatkomplex bilden (Biuret-Reaktion). Danach reagieren 2 Moleküle Bicinchonsäure (BCA) mit je einem reduzierten Kupferkation, wobei es zu einem intensiv violett gefärbten Reaktionsprodukt kommt, der durch seine Intensität verlässlicher zu detektieren ist als der hellblaue Komplex der ersten Reaktion. Dieser BCA/Kupfer-Komplex ist wasserlöslich und besitzt eine starke Absorption bei 562 nm, die proportional zu steigenden Proteinkonzentrationen ist.

Grundsätzlich wurden alle Proben zur Proteinbestimmung 20 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert und nur der Überstand verwendet. Bei Bedarf wurde dieser so verdünnt, dass sich die Probenkonzentrationen in der Mitte der Eichgeraden befanden, um größte Verlässlichkeit zu gewährleisten. Die Bestimmung der Proteinkonzentration geschah nach der Anleitung des Herstellers.

2.4.2 NO-Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der konstitutiv exprimierten eNOS in EA.hy926-Zellen wurde mittels RFL-6-Reporterzellassay bestimmt. RFL-6 Zellen sind Fibroblasten aus fötalen Rattenlungen, die über eine gut stimulierbare lösliche Guanylatzyklase, jedoch über keine endogene NOS verfügen. Durch NO, das entweder von NO-Donatoren freigesetzt wird oder von NO-produzierenden Zellen stammt, wird die lösliche Guanylatcyclase stimuliert und GTP in cGMP umgesetzt. Die cGMP-Produktion ist

proportional zur gebildeten NO-Menge, kann damit als Maß für die gebildete NO-Menge verwendet werden und wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Dazu werden Lysate aus den RFL-6 Zellen mit radioaktiv markiertem cGMP (^{125}I -cGMP) und einem Antikörper gegen cGMP inkubiert. Dabei konkurrieren das von den Zellen gebildete cGMP und das ^{125}I -cGMP um die Bindung mit dem Antikörper. Es kommt zur Bildung von Antikörper-cGMP-/Antikörper- ^{125}I -cGMP-Komplexen, die präzipitiert werden und deren Gehalt an radioaktiv markiertem cGMP in einem γ -Szintillationszähler bestimmt werden kann. Aus der Eichkurve errechnet sich die Menge an cGMP, die endogen von den RFL-6 Zellen gebildet wurde.

- RFL-6-Reporterzellassay

Zur Versuchsdurchführung wurden sowohl NO-Produzenten als auch die Reporterzellen standardmäßig in 24 Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die NO-Produzenten wurden zunächst 3-5x mit je 500 μl Locke's Lösung mit Natrium ($\text{LL}+\text{Na}^+$) oder Locke's Lösung ohne Natrium ($\text{LL}-\text{Na}^+$) gewaschen. Die anschließende Inkubation in 300 μl $\text{LL}+\text{Na}^+$ oder $\text{LL}-\text{Na}^+$ (mit den jeweils angegebenen Aminosäuren für 0,5 bis 2 Stunden und mit 3-4 Medienwechseln) fand bei 37°C statt. Während der letzten 30 Minuten wurde den Zellen 20, 40 oder 200 U/ml SOD (Superoxiddismutase, bovin, Sigma, Taufkirchen) zugesetzt, die als Radikalfänger eine Umwandlung des produzierten Stickstoffs zu Nitrit oder Nitrat verhindern soll. Zur NO-Messung ersetzte man schließlich die Inkubationslösung durch dieselbe Lösung, die zusätzlich 600 μM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, Sigma, Taufkirchen) sowie 10 μM Calcium-Ionophor A23187 (Sigma, Taufkirchen) enthielt. IBMX ist ein Phosphodiesteraseinhibitor, der die Umwandlung intrazellulärer cGMP-Moleküle verhindert. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde der Überstand auf die RFL-6 Reporterzellen transferiert, die zuvor 3x mit $\text{LL}+\text{Na}^+$ gewaschen und 30 Minuten in $\text{LL}+\text{Na}^+$ mit 600 μM IBMX inkubiert worden waren. Nach einer 2-minütigen Inkubation der RFL-6-Zellen (zur Stimulation der löslichen Guanylatcyclase) bei 37°C im Wasserbad wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 100 μl Natriumacetatlösung (pH 4,0) und flüssigem Stickstoff lysiert. Für den Basal- und den Maximalwert der RFL-6-Zellen inkubierte man diese nach der 30-minütigen Vorinkubation 2 min in $\text{LL}+\text{Na}^+$ mit 600 μM IBMX

(basale cGMP-Produktion) oder in LL+Na⁺ mit 600 µM IBMX und 1 µM SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin, Calbiochem, Darmstadt) als NO-Donor.

Für die Messung des Proteingehaltes der NO-Produzenten lysierte man diese für 2 Stunden bei 4° C auf einem Laborschüttler in 50 µl RIPA (Sigma, Taufkirchen) mit Proteaseinhibitor (cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim). Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde anschließend 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Es wurden 25 µl einer 1:5-Verdünnung in RIPA zur Proteinbestimmung eingesetzt (Kapitel 2.4.1).

Die basale cGMP-Produktion sowie die maximale Stimulierbarkeit der RFL-6 Reporterzellen konnte mit folgenden Kontrollen bei jedem Versuch bestimmt werden: zum Einen ergab eine 2-minütige Inkubation der RFL-6 Zellen in 300 µl LL+Na⁺ mit der entsprechend in diesem Versuch eingesetzten SOD-Menge und 600 µM IBMX den Basalwert. Dieser wurde von allen erhaltenen Werten abgezogen. Zum Anderen zeigte die Zugabe von 1 µM des NO-Donors SIN-1 (3-Morpholinosydnoniminhydrochlorid) während der Inkubation die aktuelle Stimulierbarkeit der Reporterzellen an.

- Radioimmunoassay (RIA)

Die Zelllysate wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 20000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. 20 µl des Überstandes wurden im Radioimmunoassay (RIA) verwendet. Zur Erstellung einer Eichkurve diente eine serielle Verdünnungsreihe von nicht radioaktiv markiertem cGMP (5 - 0,02 pmol) in Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 4,0). Der letzte Punkt der Eichkurve (Bindung) enthielt kein kaltes cGMP, um so die maximale Bindung des anti-cGMP-Antikörpers an das ¹²⁵I-cGMP festzustellen, die für eine gute Bindung des Antikörpers mindestens 50 % des Leerwerts betragen sollte. Allen Proben wurden 100 µl ¹²⁵I-cGMP (BioTrend, Köln, 10000 cpm) und 100 µl des 1:10⁻⁴ verdünnten α-cGMP-Antikörpers zugesetzt. Der Leerwert enthielt keinen Antikörper, stattdessen 100 µl des Antikörperverdünnungspuffers (0,01% BSA). Die Proben der Eichkurve wurden als Doppelbestimmung angesetzt.

Pipettierschema (in μl):

Röhrchen	Puffer	Probe/ Standard	^{125}I -cGMP 10.000 cpm	AK (1×10^{-4})
Eingesetztes ^{125}I -cGMP	-	-	100	-
Leerwert	200	-	100	100 (0,01 % BSA)
Bindung	200	-	100	100
Standard	150	50	100	100
Proben	180	20	100	100

Die gut durchmischten und kurz abzentrifugierten Ansätze inkubierten über Nacht bei 4°C . Die Präzipitation der cGMP-Antikörper-Komplexe erfolgte nach Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ einer 1 %-igen γ -Globulinlösung in Natriumacetatpuffer und 2,5 ml eiskaltem Isopropanol. Die Proben zentrifugierten bei $4000\ \text{g}$ und 4°C 30 min lang. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets 20 min getrocknet und anschließend im γ -Zähler analysiert. Die cGMP-Konzentrationen der Proben wurden aus der Eichgeraden bestimmt.

2.4.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

- Aufreinigung der Proben

Da die High performance liquid chromatography (HPLC) ein sehr sensitives Verfahren ist, müssen die Proben vor ihrem Durchlauf durch die HPLC-Säulen gründlich aufgereinigt werden. Das bedeutet, es sollten möglichst viele Substanzen entfernt werden, die die Messung stören könnten. In unserem Fall der Messung basischer Aminosäuren sind dies die neutralen und sauren Aminosäuren, die bei der Aufreinigung entfernt werden. Hierzu bedienen wir uns an Aufreinigungssäulen mit sog. Kationenaustauscher- und Umkehrphaseneigenschaften (Oasis MCX-Säulen von Waters, Etten-Leur, Niederlande), deren polymeres Sorbent eine oberflächengebundene Sulfonsäuregruppe (SO_3^-) trägt und daher eine hohe Selektivität für basischen Verbindungen gewährleistet.

Die zu analysierenden Überstände wurden mit PBS (pH 7) auf 1 ml Volumen gebracht und direkt eingesetzt. Zelllysate wurden zunächst 15 min bei $20000\ \text{g}$ und

4° C abzentrifugiert. In dieser Zeit konnten 1 - 2 µl des 1 mM Standards vorgelegt werden, sodass sich 2 nmol eines Gemisches von L-Monomethylarginin und L-Homoarginin in einem neuen 2 ml-Reaktionsgefäß befanden; die Menge ist abhängig von der erwarteten Probenmenge und soll in derselben Größenordnung liegen. Die Proben wurden nach der Zentrifugation zum Standard zugegeben, alles vollständig im SpeedVac unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff evaporiert und dann in jeweils 1 ml PBS, der zuvor auf einen pH von 7,0 bis 7,5 gebracht wurde, aufgenommen. Die Oasis-Säulen wurden unter Unterdruck gesetzt und zuerst mit je 1 ml Methanol, dann mit 1 ml Wasser (für die HPLC) äquilibriert. Die Proben wurden auf die Säulen überführt und erst mit je 1 ml 0,1 N HCl, dann mit 1 ml Methanol gewaschen, damit saure und neutrale Bestandteile entfernt werden. Nach Verwerfen der Waschlösungen konnte nun der basische Anteil der Probe mit je 1 ml Elutionslösung (Methanol:Wasser:Ammoniak im Verhältnis 5:4:1) aus der Oasis-Säule gelöst werden. Nun wurden die Proben nochmals im SpeedVac evaporiert, dann in 100 – 200 µl Boratpuffer aufgenommen und derivatisiert.

- Automatische Derivatisierung und Analyse

Da die Messung zellspezifischer Aminosäurekonzentrationen sehr empfindliche HPLC-Methoden erfordert, müssen die Aminosäuren mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen derivatisiert werden, um die notwendige Sensitivität zu erreichen. Dabei erweist sich Orthophthaldialdehyd (OPA) als praktikables Derivatisierungsmittel, da die Polaritätsbeiträge der einzelnen Aminosäurereste in den Derivatisierungsprodukten stärker als bei anderen Fluorophoren für die Trennleistung zur Geltung kommen. Die unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeiten und Stabilitäten der einzelnen Aminosäure-OPA-Derivate behindern eine quantitative Analytik der HPLC nicht, wenn der Analysengang zeitlich standardisiert wird, was bei dem verwendeten Autosampler (Spark Triathlon) durch die automatische Derivatisierung und sofortige nachfolgende Analyse gegeben ist.

Durch die Umsetzung hydrophober Fluorophoren werden hydrophile Aminosäuren in hydrophobe Derivate umgewandelt, die an hydrophoben Umkehrphasen (C8- oder C18-Ketten) bei Verwendung wässriger Eluenten zurückgehalten werden. Durch Zusatz organischer Lösungsmittel können die Retentionszeiten verkürzt werden. Die Stärke der Retention eines Derivates nimmt mit abnehmender Polarität des Eluenten

ab. Da bei einem Aminosäuregemisch das gebundene Fluorophor für alle Aminosäurederivate gleich ist, sind die Aminosäurereste ausschlaggebend für die Trennung der Derivate. OPA reagiert nur mit primären Aminen und Aminosäuren, so daß z.B. Prolin und Hydroxyprolin nicht erfasst werden. Durch die Neutralisierung der Derivatisierungslösung mit Essigsäure wird die Reaktion gestoppt und zugleich das Säulenmaterial und Kapillarleitungssystem in der HPLC-Apparatur geschont. Die optimale Reaktionszeit für die OPA-Derivatisierung liegt bei 1 - 3 Minuten, die Leistungsfähigkeit einer Säule liegt für die OPA-Derivate bei etwa 300 Injektionen. Durch stetige Erhöhung des unpolaren Lösungsmittel-Anteils (Eluent B) werden zunächst die polaren, später auch die unpolaren Aminosäurederivate von der Säule gelöst. Tab. X zeigt den Lösungsmittelgradienten zur Auftrennung der Derivate.

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	86	14
10	85	15
29	83	17
30	70	30
33	0	100
37	0	100
43	86	14

Tab. X: Gradient zur Auftrennung der Aminosäurederivate. Eluent A: 50 mM Natriumacetat mit 0,044% Triethylamin (pH 7,0), Eluent B: Acetonitril. Flussrate: 1 ml/min

Zur Derivatisierung wurden 50 µl der Probe in Mikrogelaseinsätzen (0,15 ml) im Autosampler mit weiteren 12 µl OPA-Reagens derivatisiert. Nach 90 sek wurde die Lösung mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,5 gebracht. Von diesem Reaktionsgemisch wurden nun zwischen 15 und 30 µl auf die HPLC-Säule injiziert. Die Aminosäurederivate wurden durch einen Gradienten aus 50 mM Natriumacetat plus 0,044 % Triethylamin (zur schärferen Trennung) (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) auf einer Nova-Pak® HPLC-Säule (C18, 4 µm, 3.9 x 300 mm, Waters, Eschborn) *reversed-phase* mit einer Flußrate von 1 ml/min bei einer konstanten Temperatur von 35°C aufgetrennt. Vor den beiden verwendeten Pumpen (binäres System von Bischoff, Leonberg) wurde der Gradient mit einem Degaser entgast. Die Säulen-Matrix besitzt Ketten langer unpolarer Gruppen, an die sich die derivatisierten Aminosäuren über hydrophobe Wechselwirkungen anlagern. Die Konzentration des Eluenten B wurde während des HPLC-Verlaufs immer weiter erhöht, wodurch sich

der unpolare Lösungsmittelanteil immer mehr erhöhte (Tab. X). Die polaren Aminosäurederivate lösen sich als erste von der Säule, mit zunehmender Hydrophobizität des Elutionsmittels dann auch die unpolaren. Nach Messung der Fluoreszenz (Anregung 330 nm; Emission 450 nm; Fluoreszenzdetektor Hitachi) wurde das erhaltene Chromatogramm mit dem Programm McDAcq (Bischoff) ausgewertet.

Um eine präzise Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Aminosäuren zu gewährleisten, wurde in kritischen Fällen zu einer weiteren Probe des Originallysates die zu bestimmende Aminosäure zugesetzt (spiken). So können auch zwei eng nebeneinander liegende und teilweise überlappende Peaks identifiziert werden.

2.4.4 Lösungen

Elutionslösung für HPLC-Proben

Methanol:Wasser:Ammoniak im Verhältnis 5:4:1, d.h. bei 15 ml

7,5 ml Methanol

6,5 ml Wasser

1,5 ml Ammoniak

0,5 M Borat-Puffer

2,5 g Natriumtetraborat (wasserfrei)

ad 100 ml Aqua bidest., mit 1M HCl auf pH 10 einstellen, 5 min kochen

Orthophthaldialdehyd-Reagenz (OPA)

	Endkonzentration
100 mg OPA	0,5M
9 ml Methanol	
1 ml Borat-Puffer	50 mM
100 µl 2-Mercaptoethanol	

Eluent A

	Endkonzentration
8,2 g Natriumacetat (wasserfrei)	0,5M
2 l Aqua bidest.	
880 µl Triethylamin	0,044%
pH-Wert mit 1M HCl auf 7,0 einstellen, Lösung über eine Fritte filtern	

Eluent B

Acetonitril (gradient grade)

10x Locke's Lösung mit Natrium (LL+Na⁺)

	Endkonzentration
90 g NaCl	154 mM
4,18 g KCl	5,6 mM
2,03 g MgCl ₂	1 mM
23,83 g HEPES	10 mM
3,02 g NaHCO ₃	3,6 mM

ad 1 l Aqua bidest., mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren;

vor Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen und pro ml Locke's Lösung 2 µl 1 M CaCl₂ (Endkonzentration 2 mM) und 5,6 µl steril filtrierte 1 M Glucose (Endkonzentration 5,5 mM) zugeben

10x Locke's Lösung ohne Natrium (LL-Na⁺)

	Endkonzentration
52,06 g Cholinchlorid	157,6 mM
836 mg KCl	5,6 mM
406 mg MgCl ₂	1 mM
23,83 g HEPES	10 mM

ad 200 ml Aqua bidest., mit KOH auf pH 7,4 einstellen;

vor Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen und pro ml Locke's Lösung 2 µl 1 M CaCl₂ (Endkonzentration 2 mM) und 5,6 µl steril filtrierte 1 M Glucose (Endkonzentration 5,5 mM) zugeben

Glucose

9,9 g Glucose

ad 50 ml entmin. Wasser, steril filtrieren, bei 4-8°C lagerfähig

Endkonzentration

1 M

IBMX

13,4 mg 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)

10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

Aliquots bei -70°C lagern

Endkonzentration

600 mM

SOD

100 mg Superoxiddismutase (SOD)

500 µl 1 M KH₂PO₄

Aliquots bei -70°C lagern

Endkonzentration

1000 U/ml

Kalzium-Ionophor (A23187)

10 mg Ca-Ionophor (A23187)

1,9 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

Aliquots bei -70°C lagern

Endkonzentration

10 mM

3-Morpholinosydnonimine-hydrochlorid (SIN-1)

1 mg 3-Morpholinosydnonimine-hydrochlorid (SIN-1)

4,85 ml Phosphatpuffer pH 5,5

Aliquots lichtgeschützt bei -20°C lagern

Endkonzentration

1 mM

20x Natriumacetatpuffer

68,04 g Natriumacetat

ad 500 ml Aqua bidest.

Endkonzentration

1 M

28,5 ml Essigsäure 1 M
ad 500 ml Aqua bidest.
gelöstes, 1 M Natriumacetat zur 1 M Essigsäure zugeben bis pH 4,0 erreicht ist
(etwa 250 ml NaAcetat zu 500 ml Essigsäure);
für den Radioimmunoassay 1:20 verdünnen (also auf 50 mM Endkonzentration
einstellen)

Antikörperverdünnungspuffer

	Endkonzentration
50 mg BSA	0,01%
ad 500 ml 50 mM Natriumacetat	

1% γ -Globulin-Lösung

	Endkonzentration
1 g γ -Globulin	1%
ad 100 ml 50 mM Natriumacetat	

2.5 Entwicklung eines Protokolls zur ADMA-Exportmessung an humanen PBMC

Im Rahmen eines translationellen Ansatzes in Zusammenarbeit mit der 2. Medizinischen Klinik soll ein Protokoll entwickelt werden zur Isolation von humanen PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) und einer Messung des Exportes von ADMA und L-Arginin durch das System y^+ und y^+L in diesen Zellen. Das Blut der Patienten wird eingeteilt in Kontrollpatienten ohne Stenosen und Patienten mit Stenosen in allen drei Stämmen der Herzkranzgefäße, was uns die Möglichkeit bietet, das Protokoll an den extremsten KHK-Patienten (koronare Herzkrankheit) zu etablieren und die Wahrscheinlichkeit erhöht, Unterschiede im Export endogenen ADMA zu differenzieren.

Ausschlusskriterien für Patienten waren eine Therapie mit Statinen oder organischen Nitraten, da uns keine Informationen über deren mögliche Auswirkungen auf die Expression und/oder Aktivität der von uns untersuchten Transportsysteme vorliegen; auch eine Therapie mit L-Arginin würde die Ergebnisse verfälschen, da dieses die Blutzellen im Vorfeld bereits von ADMA depletieren würde. Weitere Ausschlusskriterien waren eine instabile Angina oder ein Myokardinfarkt in den letzten zwei Monaten vor Blutentnahme oder ein chirurgischer oder perkutaner Eingriff zur Revaskularisierung innerhalb der letzten drei Monate. Eine Revaskularisierung bezeichnet die Entfernung eines Passagehindernisses in verschlossenen Blutgefäßen durch Operation mit Anlage eines Umgehungskreislaufs (Bypass), Thrombolyse oder Aufdehnung einer Engstelle durch einen Ballonkatheter (PTCA = perkutane transluminale coronare Angioplastie, Katheterdilatation). Auch klinisch relevante Nieren- oder Leberkrankheiten stellten Ausschlusskriterien dar, da diese die endogene ADMA-Produktion verstärken kann. Weitere Kriterien waren eine signifikante vaskuläre Herzkrankheit, hypertrophe Kardiomyopathie, ein vermindertes Herzausstoßvolumen von unter 35 % und/oder ein Durchmesser des linken Ventrikels von über 60 mm und klinische Anzeichen einer Stauungsinsuffizienz.

Risikofaktoren für kardiovaskuläre Herzkrankheiten wie Adipositas, Diabetes und Bluthochdruck können keine Ausschlusskriterien sein, da diese zu viele Patienten ausschließen.

Weiterhin wurde eine Außengruppe aus Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie rekrutiert, die sowohl bei der Entwicklung des Protokolls Blut spendeten als auch später als junge, gesunde Kontrollen dienten.

2.5.1 Isolation von PBMC (peripheral blood mononuclear cell)

Da wir keine Endothelzellen von Patienten bekommen können, sollen deren periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus frisch entnommenem Blut der Patienten isoliert und untersucht werden. Diese Zellpopulation enthält einkernige Blutzellen mit rundem Zellkern, beispielsweise Lymphozyten (T-, und B-Zellen und natürliche Killerzellen), Monozyten aber auch Makrophagen.

Vom erhaltenen Citratblut (ungefähr 30 ml) wurden zunächst 500 µl zur Bestimmung der Gesamtkonzentration von L-Arginin, ADMA und SDMA entnommen und die enthaltenen Erythrozyten bei 4° C und 600 g für 15 min zentrifugiert, um dann vorsichtig zirka 150 µl Plasma zur HPLC-Analyse abzunehmen.

Das übrige Citratblut wurde mit 1 mM Citrat in DPBS auf ein Volumen von 50 ml gebracht und je 25 ml davon wurden vorsichtig auf jeweils 15 ml Lymphocyte Separation Medium 1077 (PAA, Pasching) geschichtet. Dieses formiert sich bei der Zentrifugation zu einem Dichtegradienten, der hauptsächlich aus Polysuccrose besteht. Nun wurde bei Raumtemperatur und 260 g für 25 min zentrifugiert, wobei sich die Erythrozyten unter den Dichtegradienten verteilten, die PBMC blieben als trüber Ring darauf liegen und das Plasma darüber enthielt die Thrombozyten (Abb. I). Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Bremsfunktion der Zentrifuge ausgeschaltet war, da sich sonst der Gradient und mit ihm die separierten Zellen wieder vermischen würden. Das Plasma wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und der trübe Ring der PBMCs über dem Gradienten wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Eventuelle Verunreinigungen der isolierten PBMCs durch Überführung eines Teils des Gradienten wurden in Kauf genommen, da die Zellen im Folgenden 3x mit jeweils 30 ml eiskalter Locke's Lösung gewaschen und dazwischen jeweils 10 min bei 425 g und 4° C zentrifugiert. Nach den Waschschritten wurden die PBMCs in 4 ml Locke's Lösung aufgenommen und eine 1:100-Verdünnung in DPBS davon gezählt. Von je 500 µl Zellsuspension wurden

eine Protein- und eine RNA-Isolation gemacht. Die restlichen 3 ml wurden für den Sofortexportversuch verwendet.

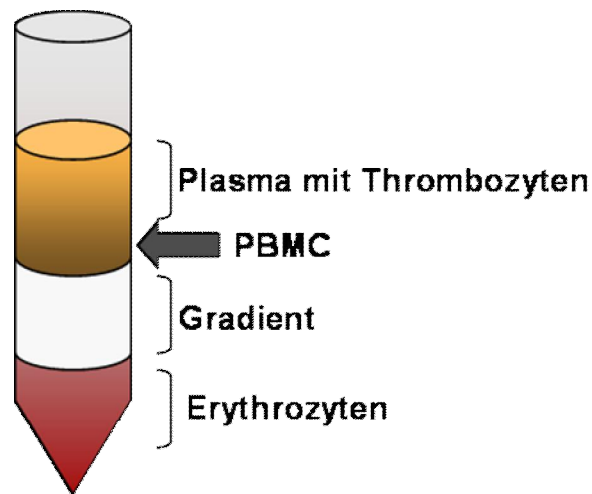


Abb. I: Schema des Dichtegradienten und der Verteilung der Blutzellen nach Zentrifugation.

2.5.2 Proteinisolation

Die Zellen wurden 5 min bei 4° C und 600 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl RIPA-Puffer (Sigma, Hamburg) mit Proteaseinhibitor (cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) für 1 h im über Kopf-Schüttler lysiert. Bis zur Proteinbestimmung wurden die Proben bei -80° C gelagert.

2.5.3 RNA-Isolation

Die Zellen wurden 5 min bei 4° C und 600 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl RLT-Puffer mit 10% β-Mercaptoethanol aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) durch Vortexen lysiert. Dieses Lysat wird zur Homogenisation auf Shreddersäulen (Qiagen, Hilden) aufgebracht und 2 min bei 20000 g zentrifugiert. Die übrige RNA-Isolation wird nach Angaben des Herstellers vollendet.

2.5.4 ADMA- und L-Argininexport an isolierten PBMC

Jeweils 1 ml der in Locke's Lösung resuspendierten PBMCs wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt, in die vorher entweder keine Aminosäure, 1 mM L-Lysin oder 1 mM L-Leucin in der Endkonzentration gegeben wurde. Die Reaktionsgefäße wurden 5 min im 37° C-Wasserbad schwimmend inkubiert, wobei jede Minute einmal invertiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben 5 min bei 600 g und 4° C abzentrifugiert und die Überstände abgenommen und eingefroren. Dann wurde das Pellet 2x mit je 1 ml eiskalter Locke's Lösung gewaschen und dazwischen jeweils 5 min bei 600 g und 4° C abzentrifugiert. Die Zellen wurden abschließend in je 200 µl Ethanol (70 %) lysiert, um die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen bestimmen zu können.

2.6 Statistik

Die Auswertung und Berechnung der Statistik erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 4.03.354 (GraphPad Software Inc., San Diego). Falls nicht anders angegeben, wurden alle Experimente drei Mal als unabhängige Versuche durchgeführt, sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben und wurden mit dem dem one way-ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni-post hoc-Test durchgeführt. Die Signifikanzen (***) kennzeichnen P-Werte $< 0,001$, (**) P-Werte $< 0,01$ und bei (*) lag der P-Wert $< 0,05$, als ns werden P-Werte $> 0,05$ bezeichnet.

3. Ergebnisse

Teil I: *Xenopus laevis*-Oozyten

3.1 Testung individueller Transporter an *Xenopus laevis*-Oozyten

Um mögliche Exportproteine für die basischen Aminosäuren ADMA und SDMA zu identifizieren, wurden Exportstudien an *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt. Hierzu wurde die jeweilige cRNA des basischen Aminosäuretransporters in Oozyten injiziert (System γ^+L wurde immer im Verhältnis 1:1 mit cRNA für 4F2hc ko-exprimiert; System $b^{0,+}AT$ im Verhältnis 1:1 mit der cRNA für rbat). Nach zwei Tagen Expressionszeit bei 18° C wurden in jede Oozyte entweder 3,5 nmol ADMA oder SDMA alleine oder zusammen mit 35 nmol L-Arginin injiziert. Je drei Oozyten gleichzeitig wurden dann sofort in Natriumaufnahmepuffer ohne Aminosäuren oder mit 1 mM L-Ornithin oder mit 1 mM L-Leucin für 30 min bei 20°C inkubiert. Der Überstand wurde mittels HPLC auf die dorthin exportierte ADMA- oder SDMA-Menge analysiert.

Abbildung 1 zeigt, dass alle untersuchten Membrantransporter ADMA gemäß ihren beschriebenen Eigenschaften exportieren konnten: der humane CAT-1 vermittelte ADMA-Transport nur gegen die basische Aminosäure L-Ornithin, wohingegen die beiden Isoformen von γ^+LAT ADMA nicht nur gegen das basische L-Ornithin, sondern auch gegen die neutrale Aminosäure L-Leucin exportierten.

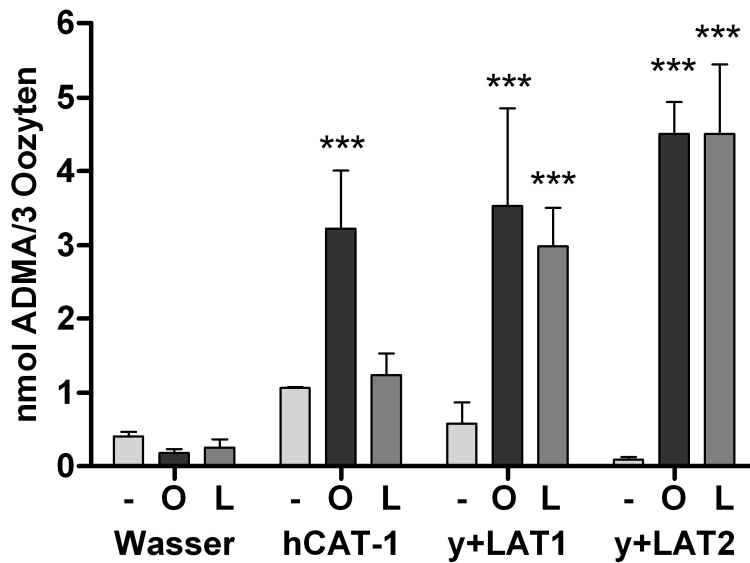


Abb. 1: Durch hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 vermittelter ADMA-Export aus *Xenopus laevis*-Oozyten. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit jeweils 35 ng der angegebenen cRNA injiziert (y⁺LATs wurden im Verhältnis 1:1 mit cRNA für 4F2hc ko-injiziert). Nach zwei Tagen Expression bei 16-18°C wurden die Oozyten 3x in Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und 4-6 h darin depletiert. Danach wurden 35 nl einer 0,1M ADMA-Lösung injiziert und jeweils 3 Oozyten zusammen in Na⁺-Aufnahmepuffer ohne Aminosäuren (-, hell), mit 1 mM L-Ornithin (O, dunkel) oder mit 1 mM L-Leucin (L, grau) für 30 min bei 20° C im Wasserbad inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen und mittels HPLC auf die Menge des exportierten ADMA analysiert. Die Statistik wurde mit dem two way-ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni-post hoc-Test gegen die Wasser-injizierte Gruppe durchgeführt, die mit Sternen versehenen Säulen markieren die Signifikanzen der Transporter- gegen die Wasser-injizierten Oozyten.

Ebenso wurde der basische Aminosäuretransporter b^{0,+}AT auf einen möglichen ADMA-Export in *Xenopus laevis*-Oozyten untersucht (Abb. 2). Er zeigte in Gegenwart von L-Ornithin als Austauschsubstrat einen höheren ADMA-Export als gegen L-Leucin.

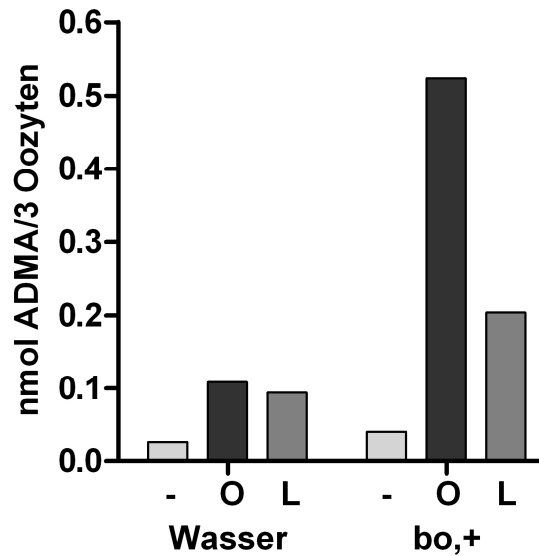


Abb. 2: Durch $b^{0,+}$ vermittelter ADMA-Export aus *Xenopus laevis*-Oozyten. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit jeweils 35 ng für $b^{0,+}$ kodierende cRNA injiziert (im Verhältnis 1:1 mit cRNA für rBAT). Nach zwei Tagen Expression bei 18°C wurden die Oozyten 3x in Na^+ -Aufnahmepuffer gewaschen und 4-6 h darin depletiert. Es wurden 35 nl einer 0,1M ADMA-Lösung injiziert und jeweils 3 Oozyten in Na^+ -Aufnahmepuffer ohne Aminosäuren (-, hell), mit 1 mM L-Ornithin (O, dunkel) oder mit 1 mM L-Leucin (L, grau) für 30 min bei 20°C im Wasserbad inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen und mittels HPLC auf die Menge des exportierten ADMA analysiert. Angegeben sind die Werte aus einem Versuch.

Weiterhin wurde nach Expression der Transporter 3,5 nmol symmetrisches Dimethyl-L-Arginin (SDMA) in jede Oozyte injiziert und ebenso verfahren. Dabei ergab sich wiederum, dass der humane CAT-1 SDMA gegen die basische Aminosäure L-Ornithin exportieren konnte. Die System γ^+L -Transporter hingegen exportierten SDMA nicht nur bei Vorhandensein des basischen L-Ornithins als Austauschsubstrat, sondern auch in Gegenwart des neutralen L-Leucins (Abb. 3).

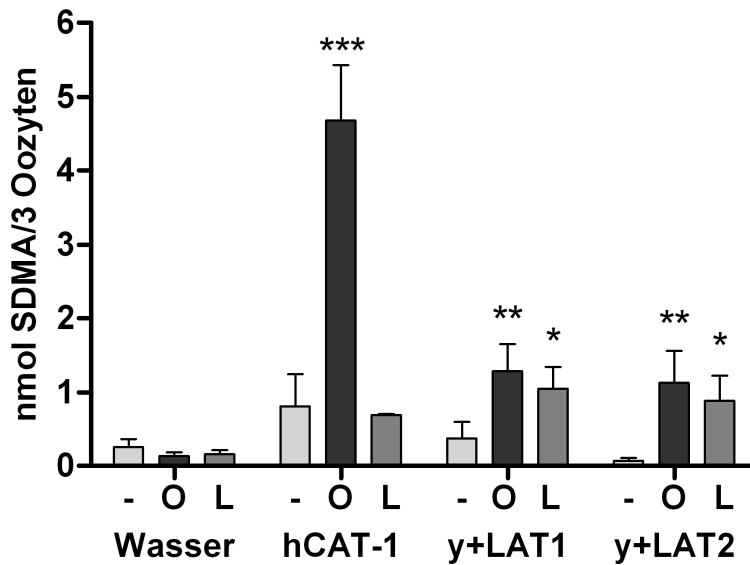


Abb. 3: Durch hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2 vermittelter SDMA-Export aus *Xenopus laevis*-Oozyten. Der Versuch wurde wie bei Abb.1 beschrieben durchgeführt, das getestete Substrat war hierbei SDMA. Die Statistik wurde mit dem two way-ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni-post hoc-Test gegen die Wasser-injizierte Gruppe durchgeführt, die mit Sternen versehenen Säulen markieren die Signifikanzen der Transporter- gegen die Wasser-injizierten Oozyten.

In humanem Plasma kommen die Aminosäuren L-Arginin und ADMA in einem Verhältnis von ungefähr 100:1 vor, was die Frage nach der Gleichbehandlung der beiden Aminosäuren durch die Transporter aufwarf. Bei einer gleichzeitigen Injektion beider Aminosäuren in einem bestimmten Verhältnis sollten die Transporter bei ähnlich ausgeprägter Substraterkennung beide Aminosäuren im gleichen Verhältnis exportieren. Um dies zu prüfen, wurde nach Expression der Transporter ein Gemisch aus L-Arginin und ADMA im Verhältnis 10:1 und 100:1 injiziert und der Export beider Aminosäuren in Gegenwart von unterschiedlichen Austauschsubstraten untersucht. Bei der Nachstellung des in humanem Plasma vorherrschenden Verhältnisses von 100:1 konnte die exportierte ADMA-Menge aufgrund der hohen Ähnlichkeit des nur in geringen Mengen vorliegenden ADMA mit dem prominenten L-Arginin nicht durch die HPLC detektiert werden. Nach Injektion eines L-Arginin/ADMA-Verhältnisses von 10:1 hingegen konnten alle Aminosäuren bestimmt werden.

~ Ergebnisse ~

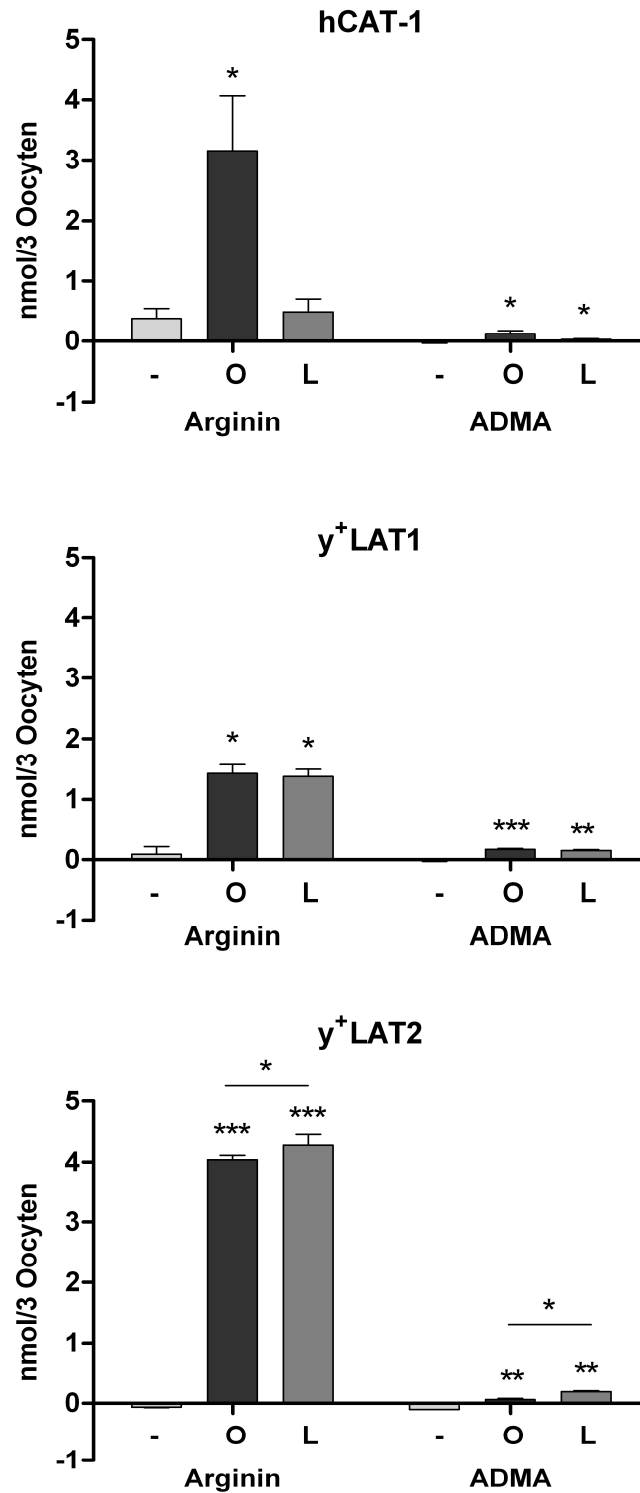


Abb. 4: Substratbehandlung durch die Transporter hCAT-1, y⁺LAT1 und y⁺LAT2.

Xenopus laevis-Oocyten wurden mit jeweils 35 ng der angegebenen cRNA injiziert (y⁺LATs wurden immer im Verhältnis 1:1 mit cRNA für 4F2hc ko-injiziert). Nach zwei Tagen Expression bei 16-18°C wurden die Oocyten 3x in Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und 4-6 h darin depletiert. Es wurden 3,5 nmol ADMA und 35 nmol L-Arginin injiziert und jeweils 3 Oocyten zusammen in Na⁺-Aufnahmepuffer ohne Aminosäuren (-, hell), mit 1 mM L-Ornithin (O, dunkel) oder mit 1 mM L-Leucin (L, grau) für 30 min bei 20° C im Wasserbad inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen und mittels HPLC auf die Menge des exportierten L-Arginins und ADMAs analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus 2 Oozytenchargen, die statistische Analyse wurde mit dem one-way-ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni-post hoc-Test gegen die Gruppe ohne Austauschsubstrat durchgeführt.

Abbildung 4 zeigt die exportierten L-Arginin- und ADMA-Mengen gegen Puffer, L-Ornithin und L-Leucin, Tab. XI gibt das im Extrazellulärpuffer gefundene Verhältnis von L-Arginin zu ADMA an. Hierin zeigte sich, dass der humane CAT-1 einen höheren Anteil L-Arginin als ADMA exportierte und somit vermutlich eine Präferenz für L-Arginin besitzt: bei L-Ornithin als Austauschsubstrat wurde 2,5x mehr L-Arginin im Vergleich zu den injizierten Mengen exportiert. y^+ LAT2 zeigte ebenfalls Unterschiede in der Substratbehandlung: in Gegenwart des basischen L-Ornithins wurde 6x mehr L-Arginin als ADMA exportiert, gegen das neutrale L-Leucin wurde nur noch 2x mehr exportiert, was abermals auf eine Präferenz für L-Arginin schließen lässt. Im Gegensatz dazu schien y^+ LAT1 der einzige basische Aminosäuretransporter zu sein, der L-Arginin und ADMA als Substrat gleichberechtigt behandelt, da er beide Aminosäuren zu gleichen Anteilen gegen basisches und neutrales Austauschsubstrat exportierte und das im Extrazellulärpuffer gefundene Verhältnis dem des injizierten am ehesten entsprach.

	CAT-1	y^+ LAT1	y^+ LAT2
L-Orn	25:1	8:1	63:1
L-Leu	-	9:1	22:1

Tab. XI: Exportiertes Verhältnis von L-Arginin zu ADMA. Injiziert wurden L-Arginin und ADMA jeweils im Verhältnis 10:1, das im Extrazellulärpuffer gefundene Verhältnis nach 30 min Exportzeit ist in der Tabelle angegeben. Die statistische Auswertung mit Hilfe des 2-way-ANOVA ergab eine hoch signifikante Abhängigkeit vom injizierten Transporter ($P = 0,0028$) und eine signifikante Abhängigkeit vom Austauschsubstrat ($P = 0,0218$).

Teil II: Humane Endothelzellen

3.2 Relative mRNA-Expressionen

Um die immortalisierte Endothelzelllinie EA.hy926 und auch die primären Endothelzellen HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), HCAEC (human coronary artery endothelial cells) und HCMEC (human cardiac microvascular endothelial cells) auf ihre endogen exprimierten, basischen Aminosäuretransporter zu untersuchen, wurde aus allen Zellen die Gesamt-RNA isoliert und via quantitativer real time-PCR auf ihre Expression getestet.

Eine typische Amplifikationskurve (siehe Abb. J) stellt die zunehmende Fluoreszenz (aufgetragen auf der y-Achse) des freigesetzten Reporterfarbstoffes dar. Die horizontale, orange Linie kennzeichnet den Schwellenwert (threshold), der im linearen Bereich der Kurve festgelegt wird. Die Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, um den Schwellenwert zu erreichen, bezeichnet man als ct-Wert. Wird er in Relation gesetzt zum ct-Wert einer als Referenz parallel untersuchten mRNA, kann die relative Expression des zu untersuchenden Gens bestimmt werden. Ein Unterschied von 3,3 Zyklen entspricht dabei einer um den Faktor 10 unterschiedlichen mRNA-Menge.

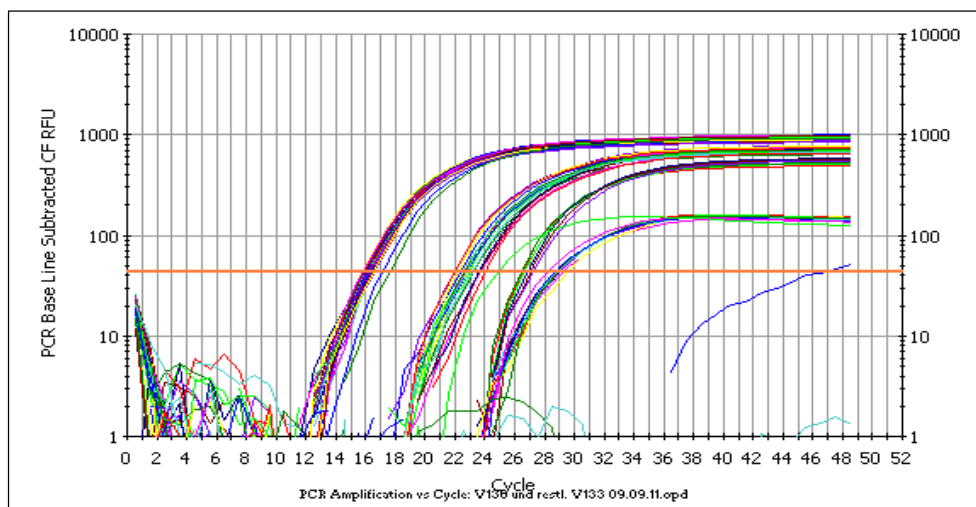


Abb. J: Repräsentative Amplifikationskurve einer quantitativen real time-PCR. Zwischen Zyklus 15 und 18 überschreitet das Referenzgen (GAPDH) den Schwellenwert, dann folgt die Überschreitung des Schwellenwertes der anderen zu untersuchenden Gene.

Eine absolute Quantifizierung, d.h. die Bestimmung der Molekülanzahl des zu untersuchenden Transkripts in der Gesamt-RNA, ist nur durch Erstellung einer Standardreihe mit seriellen Verdünnungen eines Referenztranskriptes möglich. Diese Praktik wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beabsichtigt, da eine vergleichende Auswertung der Expressionen verschiedener Gene in unterschiedlichen Zelllinien erfolgte.

Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass der humane CAT-1 in allen untersuchten Endothelzellen ähnlich hoch exprimiert war. Die stärkste hCAT-1-Expression fand sich in den HCMECs, die dort im Vergleich zu den immortalisierten Endothelzellen EA.hy926 um das 1,5-fache stärker war. Ebenfalls ähnelte sich die Expression von γ^+ LAT2 in den untersuchten Endothelzellen: im Vergleich zu EA.hy926 war die Expression in HCAEC und HCMEC ähnlich, in HUVECs fand sich nur die Hälfte der γ^+ LAT2-mRNA. γ^+ LAT1 zeichnete sich in den analysierten primären Endothelzellen als prominenteste Transporter aus. Im Vergleich zu den EA.hy926 unterschied sich sein Expressionsprofil um ein Vielfaches: HUVECs exprimierten beinahe das 20-fache, HCAEC das 40-fache und HCMEC das 60-fache an γ^+ LAT1-mRNA als sich in der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926 fand.

Die Transporter $b^{0,+}$ AT und $ATB^{0,+}$ waren in den untersuchten Endothelzellen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

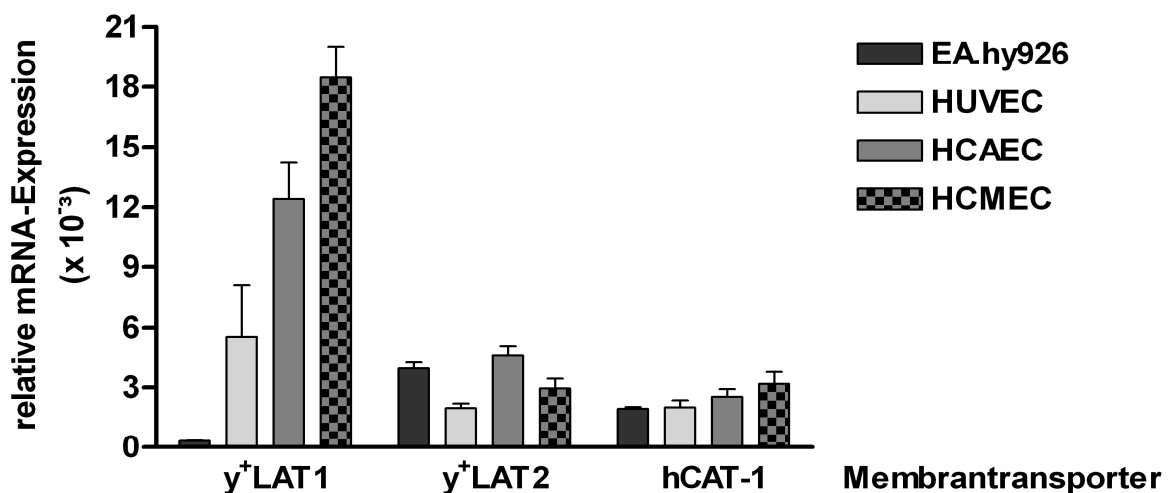


Abb. 5: Vergleich der Expressionen basischer Aminosäuretransporter in immortalisierten und primären Endothelzellen. Die Gesamt-RNA der angegebenen Zelllinien (dunkel: EA.hy926, hell: HUVEC, grau: HCAEC, grau-kariert: HCMEC) wurde aus konfluenten 24 Loch-Platten mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt und das Ergebnis auf die Expression der als Referenzgen untersuchten GAPDH bezogen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, n = 4-6 aus 3 Zellchargen.

Mit dem Verfahren der qRT-PCR wurde ebenfalls in allen Endothelzelllinien die relative mRNA-Expression des ADMA-metabolisierenden Enzyms DDAH quantifiziert (Abb. 6). Die Isoform DDAH1 war in EA.hy926 und in HUVECs ähnlich exprimiert, dagegen war in den Endothelzellen der großen und kleinen Herzgefäße (HCAEC und HCMEC) nur ein Drittel der mRNA für DDAH1 vorhanden. Mit der Isoform DDAH2 verhielt es sich reziprok: hier exprimierten sämtliche primären Endothelzellen 3x mehr DDAH2 als EA.hy926-Zellen. In allen untersuchten Endothelzellen war DDAH1 die weitaus dominantere Isoform.

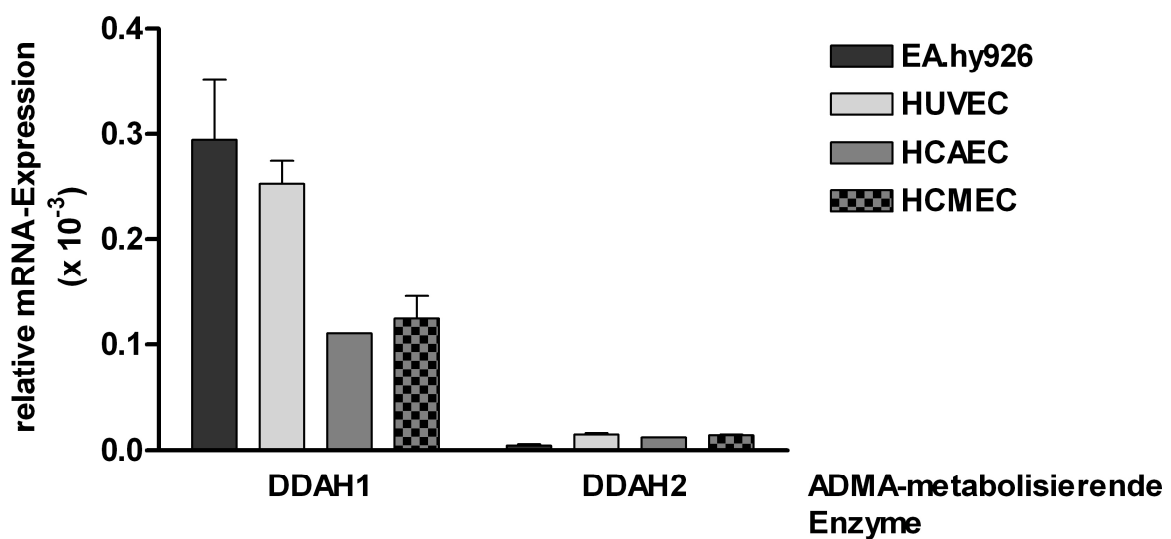


Abb. 6: Expression des ADMA-metabolisierenden Enzyms DDAH in immortalisierten und primären Endothelzellen. Der Versuch wurde wie bei Abb. 5 angegeben durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 1-12 aus 3 Zellchargen.

Um die optimale Passage für Versuche und die Variabilität von HUVECs unter Zellkulturbedingungen zu untersuchen, wurden verschiedene HUVEC-Chargen aus vier unterschiedlichen Nabelschnüren (Abb. 7, Viereck, ungefülltes Viereck, Dreieck, Kreuz) per qRT-PCR auf die Expression der Transporter γ^+ LAT1 und -2, der beiden Isoformen des ADMA-metabolisierenden Enzyms DDAH1 und -2 und der Expression der endothelialen NO-Synthase analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die mRNA-Menge in den untersuchten Genen in verschiedenen HUVECs und bei verschiedenen Passagen variieren konnte. Am Beispiel des Transporters γ^+ LAT1 war zu sehen, dass sich die Expressionen der vier unterschiedlichen HUVECs bei Passage 3 um das 5-fache unterscheiden konnten. Im Schnitt wurde in den betrachteten Genen und Passagen eine Varianz von dem 3,5-fachen bis zu dem 5,8-

fachen zwischen der minimalsten und der maximalsten Expression festgestellt. Daraufhin wurde im Folgenden die Passage 3 für Experimente verwendet, da dies eine Passage war, die relativ schnell erreicht war und die zudem bereits genügend Zellen für die Experimente aus einer Nabelschnur liefern konnte.

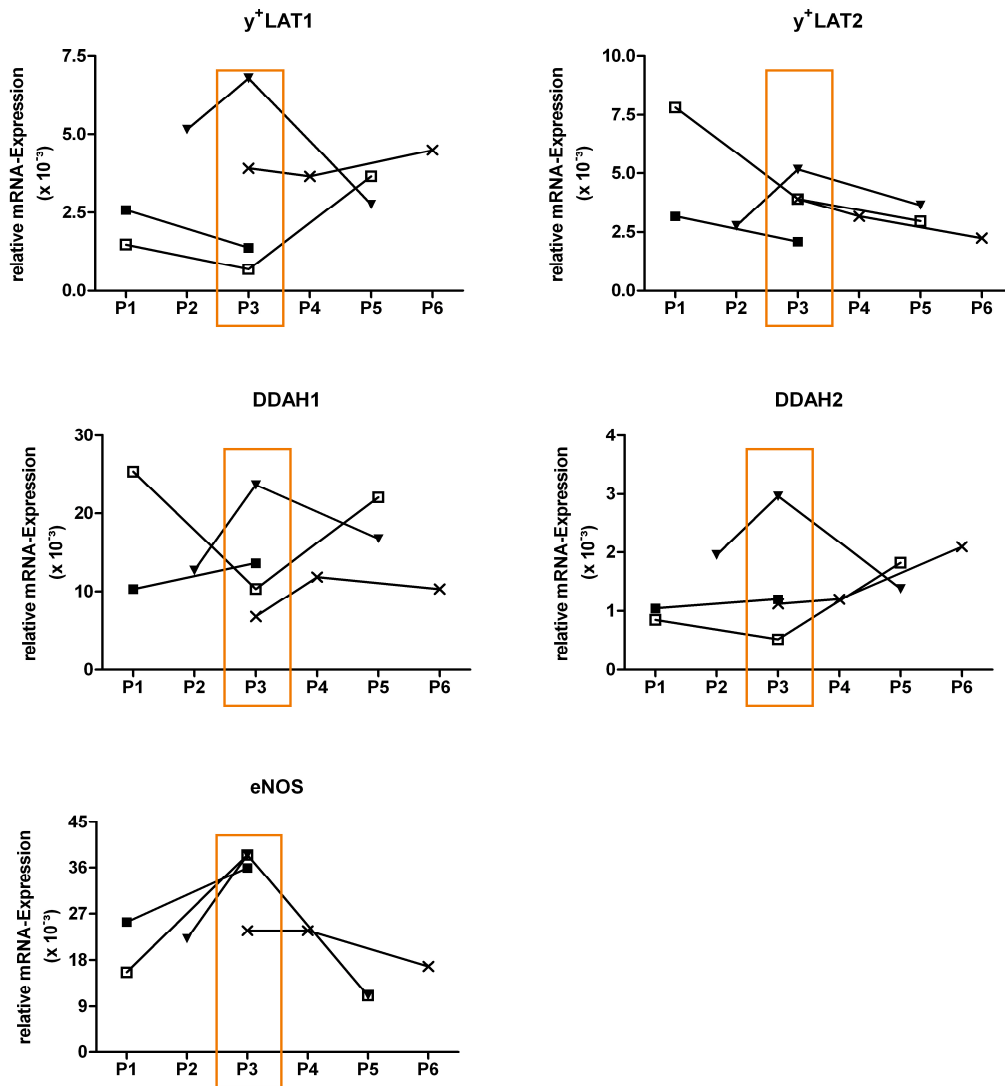


Abb. 7: Expression von y⁺LAT1 und -2, DDAH1 und -2 und eNOS in HUVECs in unterschiedlichen Passagen. Die Gesamt-RNA aus 4 verschiedenen HUVEC-Kulturen wurde bei unterschiedlichen Passagen aus konfluenten 24 Loch-Platten mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt und das Ergebnis jeweils auf die Expression der als Referenzgen benutzten GAPDH bezogen. Angegeben sind die Expressionen jeder HUVEC-Kultur bei unterschiedlichen Passagen (als Punkte dargestellt) von y⁺LAT1 (oben links), y⁺LAT2 (oben rechts), DDAH1 (Mitte links), DDAH2 (Mitte rechts) und eNOS (unten links).

3.3 Exporthemmung durch Entzug von Austauschsubstraten an EA.hy926

Es sollte eine Hemmung der Funktion der Aminosäuretransporter erreicht und die Auswirkung auf den intrazellulären ADMA-Spiegel untersucht werden. Die vorangegangenen Untersuchungen des endothelialen Expressionsprofils der basischen Aminosäuretransporter zeigten, dass sich Mitglieder der Systeme γ^+ und γ^+L in Endothelzellen befanden. Da das System γ^+L einen natriumabhängigen Aminosäuretransporter darstellt, mussten zur Hemmung der Endotheltransporter nicht nur potentielle Austauschsubstrate sondern auch Natriumionen aus dem Extrazellulärpuffer entfernt werden. Da Natrium ein essentielles Ion und von physiologischer Wichtigkeit ist, beispielsweise für Natrium-Kalium-Pumpen und Ionenkanäle, wurde zunächst eine Vitalitätsprüfung der EA.hy926-Zellen nach Inkubation in Locke's Lösung ohne Natrium durchgeführt.

Es wurde zum einen die traditionellere Methode der Trypanblaufärbung verwendet, deren Prinzip auf dem aktiven Auswärtstransport des Farbstoffes durch lebende Zellen beruht. Tote Zellen können den sauren Farbstoff nicht mehr aktiv aus dem Zellinneren hinaus befördern und erscheinen daher blau gefärbt. Zum anderen wurde ein kommerziell erhältlicher Viabilitätstest durchgeführt (Cell Titer Glo, Promega, Mannheim), der die metabolisch aktiven Zellen aufgrund ihres ATP-Gehaltes über eine proportionale Lumineszenzmessung einer zugesetzten Luciferase bestimmt.

Die Abbildung 8 zeigt repräsentative Ausschnitte der Trypanblaufärbung nach Inkubation in LL ohne Natrium (jeweils rechts) und mit Natrium (jeweils links). Diese Bilder belegen, dass sich an der Viabilität der Zellen wenig änderte unabhängig von der Dauer der Inkubationszeit in Natrium-freier Locke's Lösung.

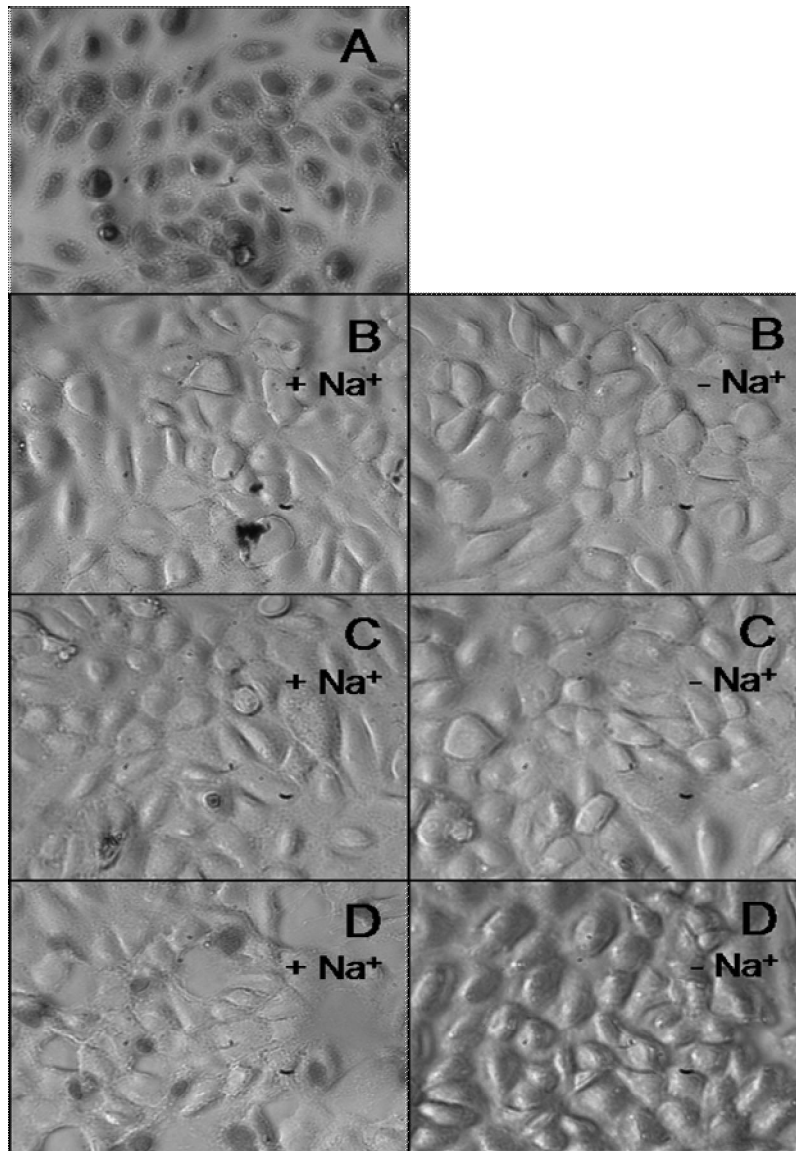


Abb. 8: Viabilitätsprüfung der EA.hy926-Zellen durch Trypanblaufärbung. Konfluente EA.hy926-Zellen wurden in 24 Loch-Platten 5x mit eiskalter LL ohne Natrium gewaschen, 30 min mit der selben Lösung depletiert (alle 10 min Mediumwechsel) und 30 (B), 60 (C) und 120 min (D) inkubiert mit LL ohne Natrium (-Na⁺) oder LL (+Na⁺). Der Extrazellularpuffer wurde abgenommen und die Zellen mit 0,18%iger Trypanblaulösung in jeweils LL-Na⁺ oder LL+Na⁺ versetzt. Die Zellen in den Löchern der Positivkontrolle (A) wurden nach 120 min Inkubation in Medium durch den Zusatz von 200 µl 70%igem Ethanol getötet/fixiert. Nach 2 min wurden alle Löcher abgesaugt und die Zellen sofort unter dem Hellfeldmikroskop betrachtet. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder aus 2 Zellchargen.

Die Lumineszenz als Maß des ATP-Gehalts der Zellen und ihrer metabolischen Aktivität wurde in Abbildung 9 normiert auf die Positivkontrolle, in der die Zellen 120 min in LL mit Natrium inkubiert wurden. Es ist aus der Abbildung gut ersichtlich, dass die metabolische Aktivität über die Zeit hinweg zwar leicht abnahm, diese jedoch keine beunruhigenden Ausmaße erreichte.

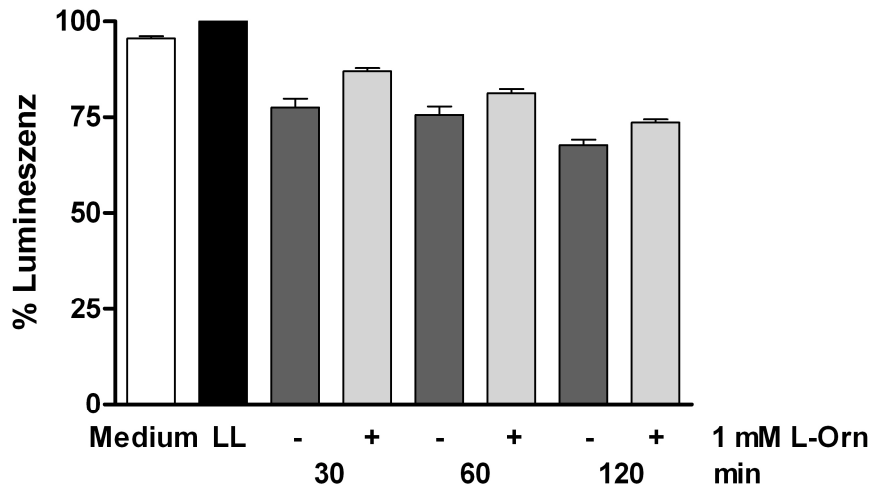


Abb. 9: Viabilitätsprüfung der EA.hy926-Zellen durch Messung der ATP-Produktion. Konfluente EA.hy926-Zellen wurden in 96 Loch-Platten 3x mit je 100 μ l eiskalter LL mit Na^+ (LL) oder ohne Na^+ (alle anderen) gewaschen (eine Reihe blieb die komplette Zeit mit Zellkulturmedium versetzt), 30 min mit der selben Lösung depletiert (alle 10 min Mediumwechsel) und für die angegebenen Zeiträume inkubiert mit Medium (weiß), LL mit Na^+ (dunkel) oder LL ohne Na^+ (hell- und dunkelgrau). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die LL ohne Na^+ für 5 min ersetzt durch dieselbe Lösung (-) oder LL ohne Na^+ mit 1 mM L-Ornithin (+). Zuletzt wurden die Zellen mit Hilfe des CellTiter Glo-Kits (Promega, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers präpariert und die Lumineszenz gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 8.

Da die basischen Aminosäuretransporter ein Austauschsubstrat benötigen, wurde durch Entzug extrazellulärer Aminosäuren eine Blockade der Transporter erreicht und die Auswirkungen einer Transporterhemmung auf den intrazellulären ADMA-Spiegel untersucht (Abb. 10). Hierzu wurden EA.hy926-Zellen zunächst gewaschen und von endogen produzierten, intrazellulären Aminosäuren befreit (depletiert), indem sie 30 min in LL ohne Natrium bei 37° C inkubiert wurden. Die Zellen wurden dann 30, 60 und 120 min bei 37° C in LL ohne Natrium inkubiert. Wo angegeben, wurde 1 mM L-Ornithin zugesetzt (+), das als basische Aminosäure ein Austauschsubstrat für die Systeme γ^+ und γ^+L darstellt. Die HPLC-Analyse des Lysats (dunkelgrün) ergab, dass sich bei Fehlen eines extrazellulär vorhandenen Austauschsubstrats (-) das endogen produzierte ADMA über die Zeit intrazellulär anreicherte, wohingegen sich im Extrazellulärmedium (B, hellgrün) wenig ADMA fand. Im Gegensatz hierzu wurde bei Anwesenheit des Austauschsubstrats L-Ornithin (+) endogen produziertes ADMA aus den Zellen heraus transportiert und fand sich somit im Extrazellulärmedium über die Zeit in ansteigender Menge wieder

(B, hellgrün). Dazu passt der intrazelluläre ADMA-Spiegel, der über die Zeit konstant blieb (A und B, +, dunkelgrün).

Bei Betrachtung der Abb. 10, B fällt zudem auf, dass zu jedem Messzeitpunkt die ADMA-Gesamtkonzentrationen bei gehemmtem und zugelassenem Transport gleich waren und somit eine Bestätigung der Messmethode darstellen.

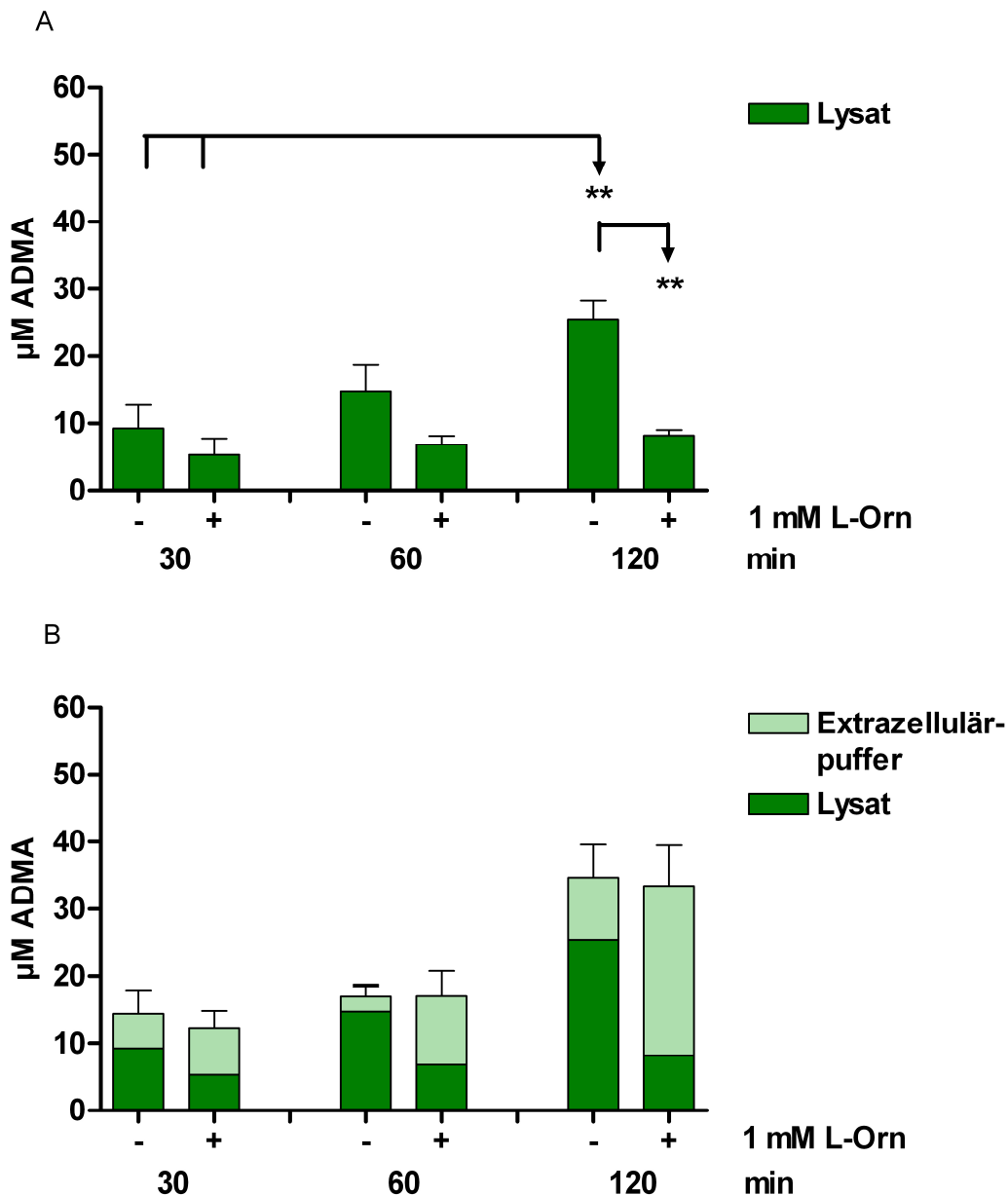


Abb. 10: Intra- und extrazelluläre ADMA-Konzentrationen nach Blockierung von System y^+ und y^+L in EA.hy926-Zellen. Konfluente EA.hy926-Zellen wurden in 6 Loch-Platten 3x mit eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen, 30 min mit derselben Lösung depletiert (alle 10 min Mediumwechsel) und für die angegebenen Zeiträume in LL ohne Na^+ und entweder ohne Aminosäuren (-) oder mit 1 mM L-Ornithin (+) inkubiert. Der Extrazellulärpuffer wurde abgenommen, die Zellen 3x mit je 1 ml eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen und mit je 300 µl 70% Ethanol lysiert. Es folgte die HPLC-Analyse des Lysats (dunkelgrün, Abb. 6A und 6B) und des Extrazellulärpuffers (hellgrün, Abb. 6B). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 3 aus 3 Zellchargen.

Die Tabelle XII zeigt das Verhältnis zwischen L-Arginin und ADMA, das die Tendenz zur intrazellulären ADMA-Akkumulation auch in Relation zur L-Argininkonzentration belegt: dieses Verhältnis tendierte zu einer Verschiebung zu Gunsten des ADMA, d.h. das absolute Verhältnis nimmt ab, weil sich die Konzentration an ADMA erhöht.

<i>Zeit [min], ohne Orn</i>	30	60	120
L-Arginin [μM]	245,5 \pm 114	429,3 \pm 52	309,8 \pm 212
ADMA [μM]	9,3 \pm 3,5	10,7 \pm 4	25,4 \pm 2,8
Ratio L-arg/ADMA	44:1 \pm 22	41:1 \pm 9	11:1 \pm 7

Tab. XII: Zeitabhängige Veränderung des Verhältnisses zwischen intrazellulärem L-Arginin und ADMA bei Transporterhemmung. Die L-Arginin- und ADMA-Konzentrationen eines jeden Einzelversuchs, die in Abb. 10 zusammengefasst dargestellt sind, wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Verhältnisse sind nicht signifikant.

<i>Zeit [min], mit Orn</i>	30	60	120
L-Arginin [μM]	277,4 \pm 22	251,8 \pm 87	368,6 \pm 138
ADMA [μM]	5,3 \pm 2,4	6,8 \pm 1,3	8,2 \pm 0,9
Ratio L-arg/ADMA	75 :1 \pm 25	42:1 \pm 19	49:1 \pm 23

Tab. XIII: Zeitabhängige Veränderung des Verhältnisses zwischen intrazellulärem L-Arginin und ADMA bei zugelassenem Transport. Die L-Arginin- und ADMA-Konzentrationen eines jeden Einzelversuchs, die in Abb. 10 zusammengefasst dargestellt sind, wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Verhältnisse sind nicht signifikant.

In Tabelle XIII ist das Verhältnis Arginin zu ADMA bei zugelassenem Transport zu sehen, das sich zwischen 30 und 60 min auch zu Gunsten des ADMA verschob. Dies mochte allerdings an der gleichzeitigen Verringerung des intrazellulären Arginingehaltes liegen. Die Verhältnisse zwischen 60 und 120 min sind hingegen sehr ähnlich, da sich zwar die intrazelluläre ADMA-Konzentration wiederum erhöhte, die L-Argininmenge diesem Trend jedoch folgte.

3.4 Exporthemmung durch Entzug von Austauschsubstraten an primären Endothelzellen

Die Transporterhemmung über den Entzug extrazellulärer Aminosäuren war bei der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926 durch eine intrazelluläre ADMA-Akkumulation gekennzeichnet, daher folgte nun eine Transporterhemmung in primären Endothelzellen, um an diesem Beispiel die intrazelluläre Akkumulation endogenen ADMAs zu prüfen (Abb. 11). Hierzu wurden primäre Endothelzellen unterschiedlicher Passagen verwendet: HUVECs wurden bei Passage 3, HCAECs bei Passage 2, 3 und 4 und HCMECs der Passage 2 und 3 verwendet. Der Inkubationszeitraum ist der jeweiligen Abbildung zu entnehmen, in der jeder Punkt einen Messzeitpunkt und damit die Inkubationsdauer darstellt.

~ Ergebnisse ~

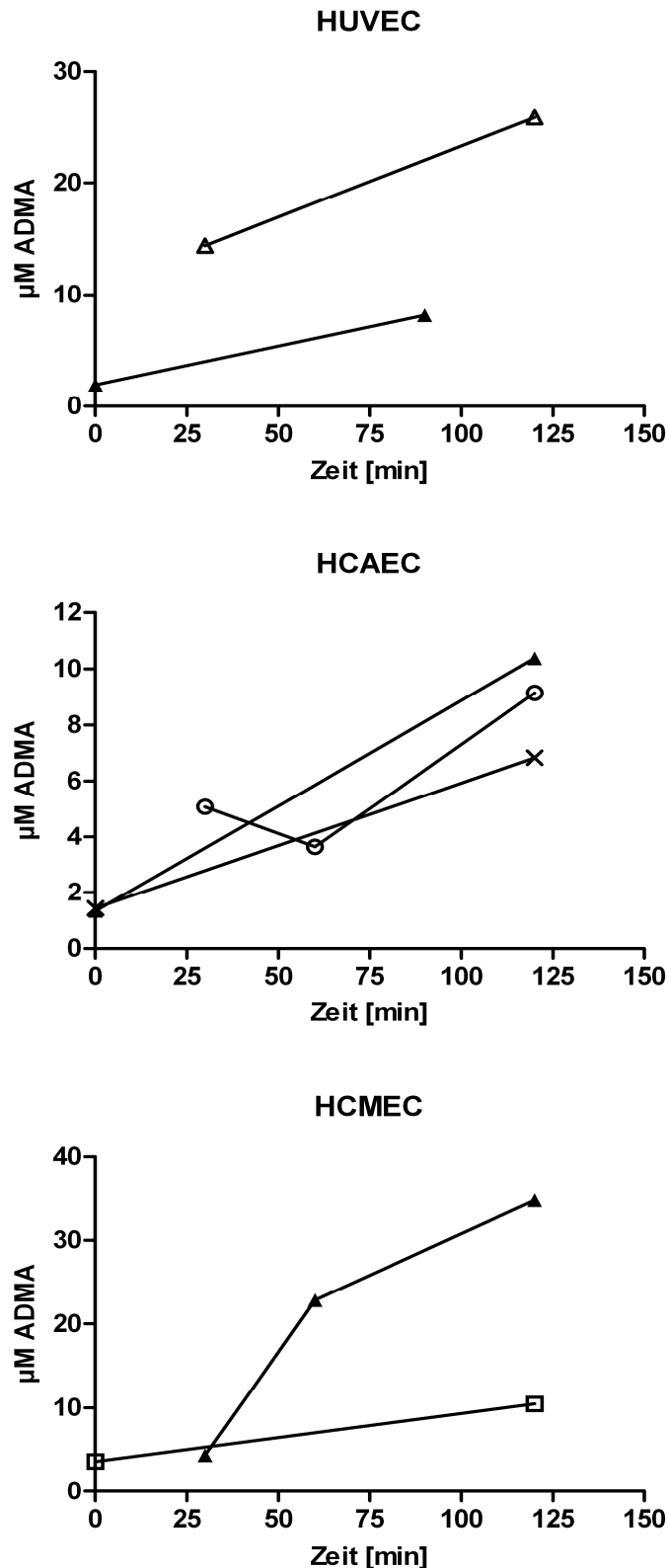


Abb. 11: Intra- und extrazelluläre ADMA-Konzentrationen nach Hemmung von System γ^+ und γ^L in primären Endothelzellen. Konfluente HUVECs (oben), HCAECs (Mitte) und HCMECs (unten) wurden in 6 Loch-Platten 3x mit eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen, 30 min mit derselben Lösung depletiert (alle 10 min Mediumwechsel) und nach dem letzten Mediumwechsel für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Der Extrazellularpuffer wurde abgenommen, die Zellen 3x mit je 1 ml eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen und mit je 300 μl 70% Ethanol lysiert. Es folgte die HPLC-Analyse des Lysats. Angegeben sind die Einzelversuche (als Zeichen) mit den Messzeitpunkten (als Punkte).

Aus der Abbildung 11 wird ersichtlich, dass alle primären Endothelzellen das endogen produzierte ADMA über die Zeit hinweg intrazellulär akkumulierten, wenn der Export über basische Membrantransporter aus der Zelle heraus unmöglich war. Diese Akkumulation entwickelte in allen Zellen einen über die Zeit hinweg ansteigenden Trend, der jedoch nicht in allen Zellen im selben Ausmaß zu finden war, beispielsweise verzeichneten die HUVECs nach 90 min ADMA-Akkumulation in einem Versuch einen 1,3-fachen ADMA-Anstieg, eine andere Charge reagierte in derselben Zeit mit einem 4-fachen intrazellulären Anstieg. Ebenso variierte der intrazelluläre ADMA-Level bei den HCAECs: hier wurde in 120 min einmal ein 5-facher, ein anderes Mal bereits ein 10-facher ADMA-Anstieg in derselben Inkubationszeit gefunden. Der 1,8-fache intrazelluläre ADMA-Anstieg in 90 min bei der dritten Messung schien mit dem in den anderen Passagen nicht vergleichbar zu sein. Auch die HCMECs zeigten Unterschiede in ihrer endogenen ADMA-Produktion, die nicht zeitabhängig zu sein schienen. Hier findet man nach 90 min Transporterhemmung einen 8-fachen ADMA-Anstieg, bei einer anderen Messung allerdings sind nach 120 min nur etwa 2,8x mehr intrazelluläres ADMA vorhanden.

3.5 Exporthemmung durch Herunterregulation des Transporters

Ziel war es, durch eine spezifische Hemmung des Systems γ^+L seinen Anteil am ADMA-Export festzustellen. Hierzu sollte eine siRNA-Transfektion durchgeführt werden, damit die transkribierte mRNA zerstört, die Translation des Systems γ^+L vermindert und somit weniger Protein für den ADMA-Export zur Verfügung stehen sollte. Die Strategie sah zunächst die Validierung und Optimierung der Methode zur Hemmung der Translation mittels siRNA-Transfektion vor.

3.5.1 Optimierung der Methode

Da ein gut funktionsfähiger Antikörper kommerziell nicht erhältlich ist, wurde zur Verifizierung der Proteinreduktion der radioaktive Importversuch angewendet. Dass eine Aufnahmedauer von 30 sek. hierbei optimal ist, war in der Arbeitsgruppe bereits bekannt und wurde durch einen einfachen Vorversuch validiert. Abbildung 12 zeigt einen Zeitverlauf der $[^3H]$ -L-Argininaufnahme mit unbehandelten EA.hy926-Zellen. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Inkubationsdauer möglichst genau eingehalten wurde; daher wurde als Besonderheit und wegen der leichteren Handhabung des Versuchsablaufs rückwärts begonnen, das heißt dass sich alle Zellen auf einer 96 Loch-Platte befanden und die radioaktive Lösung zuerst auf die Zellen mit 120 sek Inkubationsdauer pipettiert wurde. Dreißig Sekunden später erfolgte die Zugabe der Transportlösung auf die Zellen mit 90 sek Inkubationsdauer, usw. In 30 sek-Abständen folgten alle weiteren Pipettierschritte und sofort nach Zugabe der radioaktiven Lösung auf die 0 sek-Zellen wurde die Transportlösung aus der 96 Loch-Platte ausgeschlagen und die Platte 3x durch Eintauchen in eiskalte LL mit Natrium gewaschen. Das Ergebnis des Versuchs belegt, dass der lineare Anstieg des Transports im Bereich der 30 sek. Aufnahmedauer liegt, wodurch eine Detektierbarkeit auch geringer Unterschiede gegeben ist.

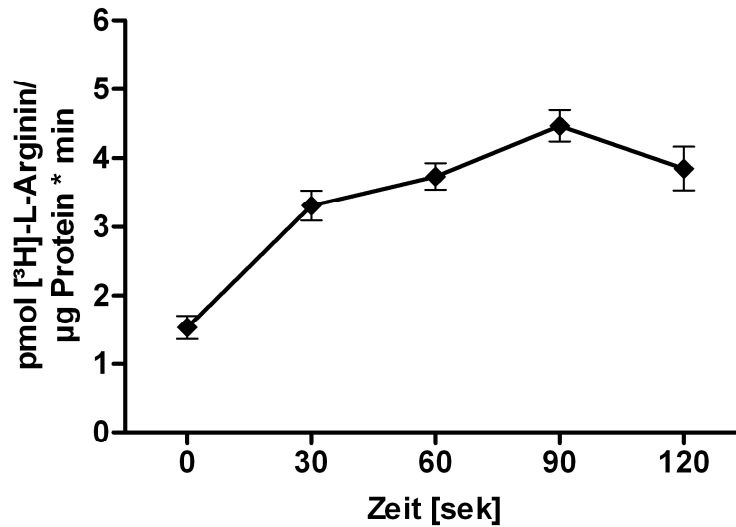


Abb. 12: [³H]-L-Arginininflux im Zeitverlauf. EA.hy926-Zellen wurden konfluent in eine 96 Loch-Platte gesät. Am nächsten Tag erfolgte eine [³H]-L-Arginininfluxmessung mit 10 µM Arginin und 5 µCi/ml [³H]-L-Arginin nach unterschiedlichen Transportzeiten von 0 bis 120 sek im 30 sek-Abstand. Nach 3-maligem Waschen der Zellen in eiskalter LL wurden diese lysiert und im β-Counter auf die importierte [³H]-L-Argininmenge analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 8.

Das Herstellerprotokoll des verwendeten Transfektionsmittels Saint-Red (Synvolux, Groningen, NL) schlägt bei Transfektion in einer 6 Loch-Platte eine Menge von 15 nmol Saint-Red und 50 pmol siRNA in einem Gesamtvolumen von 1330 µl bei der Transfektion vor. Dies entspricht einer erforderlichen siRNA-Konzentration von 37,6 nM. Die im Folgenden angegebenen siRNA-Konzentrationen beziehen sich im Falle des Systems γ^+L auf jeweils eine Isoform, das heißt bei Herunterregulation beider Isoformen befand sich die doppelte Menge siRNA in einem Loch; in diesem Fall wurde die Menge an non target-siRNA ebenfalls verdoppelt. Aus der nach unterschiedlichen Transfektionen durchgeführten qRT-PCR wurde ersichtlich, dass die jeweils höhere Menge siRNA und Saint-Red einen stärker hemmenden Effekt auf die Expression der γ^+LAT -Isoformen hatte als die getestete niedrigere Menge (Abb. 13). Der absolute Anteil der mRNA-Herunterregulation wurde im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen deutlich, die jeweils 100 % gesetzt wurden.

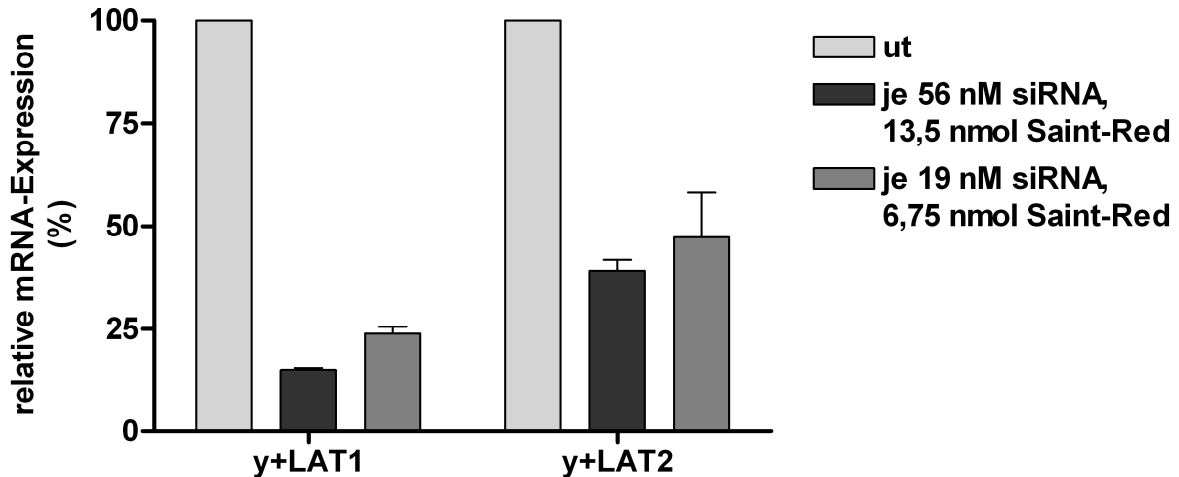


Abb. 13: Vergleich unterschiedlicher Transfektionsmittel- und siRNA-Mengen bei der Transfektion. In 6 Loch-Platten wurden EA.hy926-Zellen gleichzeitig mit je 19 nM oder je 56 nM siRNA gegen y^+ LAT1 und -2 (siRNA) und 13,5 oder 6,75 nmol des Transfektionsmittels Saint Red (Synvolux, Groningen, NL) pro Loch transfiziert. Drei Tage später wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt und das Ergebnis jeweils auf die Expression der als Referenzgen benutzten GAPDH bezogen. Angegeben sind die prozentualen Restaktivitäten jeder y^+ LAT-Isoform in Duplikaten.

Zusätzlich wurde eine qRT-PCR mit Primern für die Isoformen der DDAH durchgeführt um sicherzustellen, dass eine Herunterregulation der y^+ LATs keine Auswirkungen auf die Expression der DDAH hatte. Abbildung 14 zeigte durch eine statistische Nicht-Signifikanz, dass sich die Expression beider Isoformen nicht durch das Einbringen von siRNA gegen y^+ LAT1 und -2 veränderten.

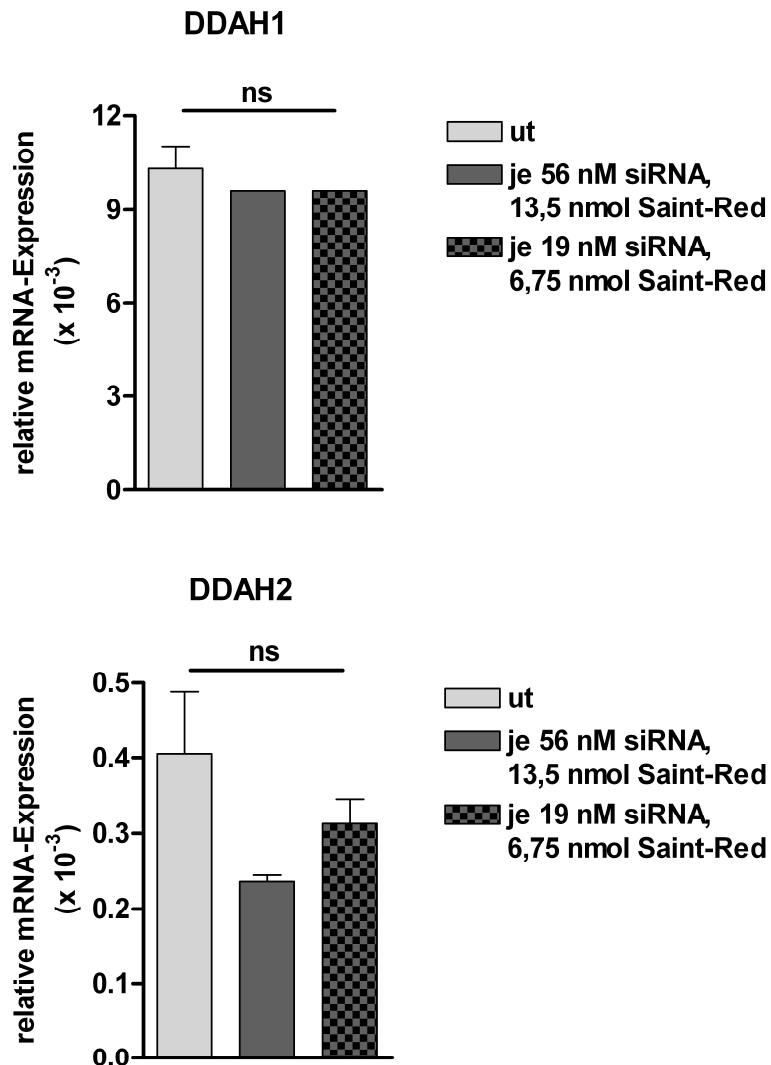


Abb. 14: Auswirkung eines Knockdowns der γ^+ LATs auf die DDAH-Expression. Die RNA der EA.hy926-Zellen, die wie in Abb. 13 beschrieben transfiziert worden waren, wurde auf eventuelle Auswirkungen auf die Expression der DDAH mit einer qRT-PCR analysiert und das Ergebnis jeweils auf die Expression der als Referenzen benutzten GAPDH bezogen (ut: untransfiziert). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM in Duplikaten.

Transkription und Translation sind fortlaufende Prozesse, sie spielen sich wiederholt in einer Zelle ab. Das Einbringen von siRNA, die die Translation hemmt, ist allerdings ein einmaliger Prozess, der ab dem Zeitpunkt der Transfektion nur für eine gewisse Zeit zu einem minimalen mRNA-Gehalt führt. Nach Ablauf dieser Zeit wird die siRNA abgebaut, was einen kaum berechenbaren Prozess darstellt, der abhängig ist von der eingebrachten siRNA-Menge, der zu transfizierenden Zelllinie und ihrer Verdopplungszeit und der Ribonukleaseaktivität (Bartlett & Davis, 2006). Daher ist es von großer Bedeutung, den Zeitpunkt der maximalen Herunterregulation des betrachteten Gens zu kennen, um weiterführende Experimente zu diesem Zeitpunkt durchzuführen. Daher wurde mit der nun festgestellten, optimalen Menge von jeweils

56 nM siRNA gegen y^+ LAT1 und -2 in 13,5 nmol Saint-Red getestet, wann der optimale Zeitpunkt für ein weiterführendes Experiment günstig war. Das Protokoll des Transfektionsmittelherstellers schlägt eine Inkubationszeit von 1 bis 5 Tagen nach Transfektion für ein Experiment vor. Daher wurde die Transfektionseffizienz nach 3, 4 und 5 Tagen auf der Expressionsebene per qRT-PCR auf die beiden Isoformen der y^+ LATs überprüft. Hierbei wurde die jeweilige Expression unbehandelter Kontrollzellen nach 3, 4 und 5 Tagen jeweils gleich 1 gesetzt. Es zeigte sich, dass bereits 3 Tage nach der Transfektion das mRNA-Gehalt der y^+ LATs im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf dem Minimum war (Abb. 15).

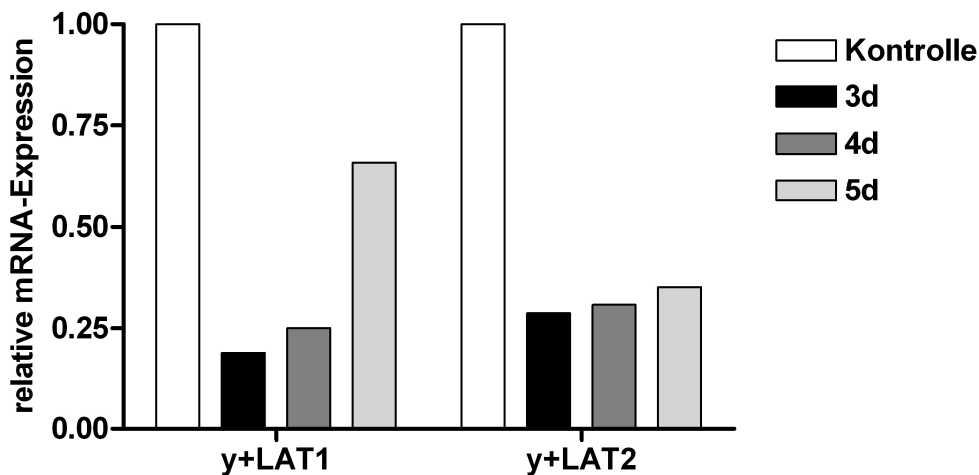


Abb. 15: Test auf den Zeitpunkt der minimalen RNA-Expression nach Transfektion mit siRNA. In 6 Loch-Platten wurden EA.hy926-Zellen mit Hilfe von je 56 nM siRNA gegen y^+ LAT1 und -2 und 13,5 nmol des Transfektionsmittels Saint Red (Synvolux, Groningen, NL) pro Loch transfiziert. Drei (dunkel), vier (grau) und fünf (hell) Tage später wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt und das Ergebnis jeweils auf die Expression der als Referenzgen benutzten GAPDH bezogen. Angegeben sind die Anteile der Restaktivitäten jeder y^+ LAT-Isoform im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle).

Zudem wurde die Abnahme der Proteinmenge durch einen [3 H]-L-Arginininflus dokumentiert (Abb. 16): Die Zellen wurden einen Tag vor dem Transportversuch von den 6 Loch- auf 96 Loch-Platten umgesetzt, damit sie am Tag des Influxversuchs fest anhafteten. Sie wurden gewaschen und es wurde zügig eine auf 37° C vorgewärmte LL mit Natrium, mit 10 μ M Arginin und 5 μ Ci/ml [3 H]-L-Arginin zupipettiert. Wo angegeben, enthielt die Lösung zusätzlich 1 mM L-Leucin (+). Nach 30 sek kompetitivem Argininimport bei 37° C wurde das Zelllysat auf die transportierte Menge an Radioaktivität analysiert.

Zur Beurteilung der minimalsten γ^+ LAT-Aktivität wurde den Zellen zusätzlich zum L-Arginin 1 mM L-Leucin während der Transportzeit zugesetzt, welches den γ^+ LAT-vermittelten Transport hemmt (+). Abbildung 16 macht deutlich, dass die transfizierten und die unbehandelten EA.hy926-Zellen mit L-Leucin für jeden Tag betrachtet immer denselben Restimport zeigten, welcher auf die Tätigkeit von System γ^+ zurückzuführen war. Die Effektivität der γ^+ LAT-Proteinreduktion nach Transfektion konnte durch den Vergleich des Argininimports der transfizierten Zellen mit dem Argininimport der transfizierten und mit Leucin versetzten Zellen bestimmt werden: dabei zeigte sich, dass die Herunterregulation der γ^+ LAT-Proteine 3 Tage nach der Transfektion maximal erfolgt war, da es hier keinen statistischen Unterschied zwischen der Transfektion und der Leucin-vermittelten Hemmung gab. An Tag 4 und 5 nach der Transfektion konnte bereits ein sich statistisch verstärkender, γ^+ LAT-vermittelter Transport beobachtet werden. Dieser war durch Zugabe von Leucin hemmbar und zeigte damit, dass bereits wieder γ^+ LAT-Protein exprimiert wurde. Dieser Umstand wird im unteren Graph der Abbildung 16 dargestellt, in dem die Leucin-hemmbareren Transportanteile von den korrespondierenden Gesamtimporten subtrahiert wurden und daher nur die γ^+ LAT-Aktivität zeigen: nach 3 Tagen war diese in den γ^+ LAT-herunterregulierten EA.hy926 auf ein Minimum von 12,5 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesunken. Nach 4 Tagen lag die γ^+ LAT-vermittelte Transportaktivität in den transfizierten Zellen bei 28,6 % und nach 5 Tagen bereits bei 41,7 %.

Daher wurden alle folgenden Experimente mit γ^+ LAT-herunterregulierten Zellen 3 Tage nach der Transfektion durchgeführt.

~ Ergebnisse ~

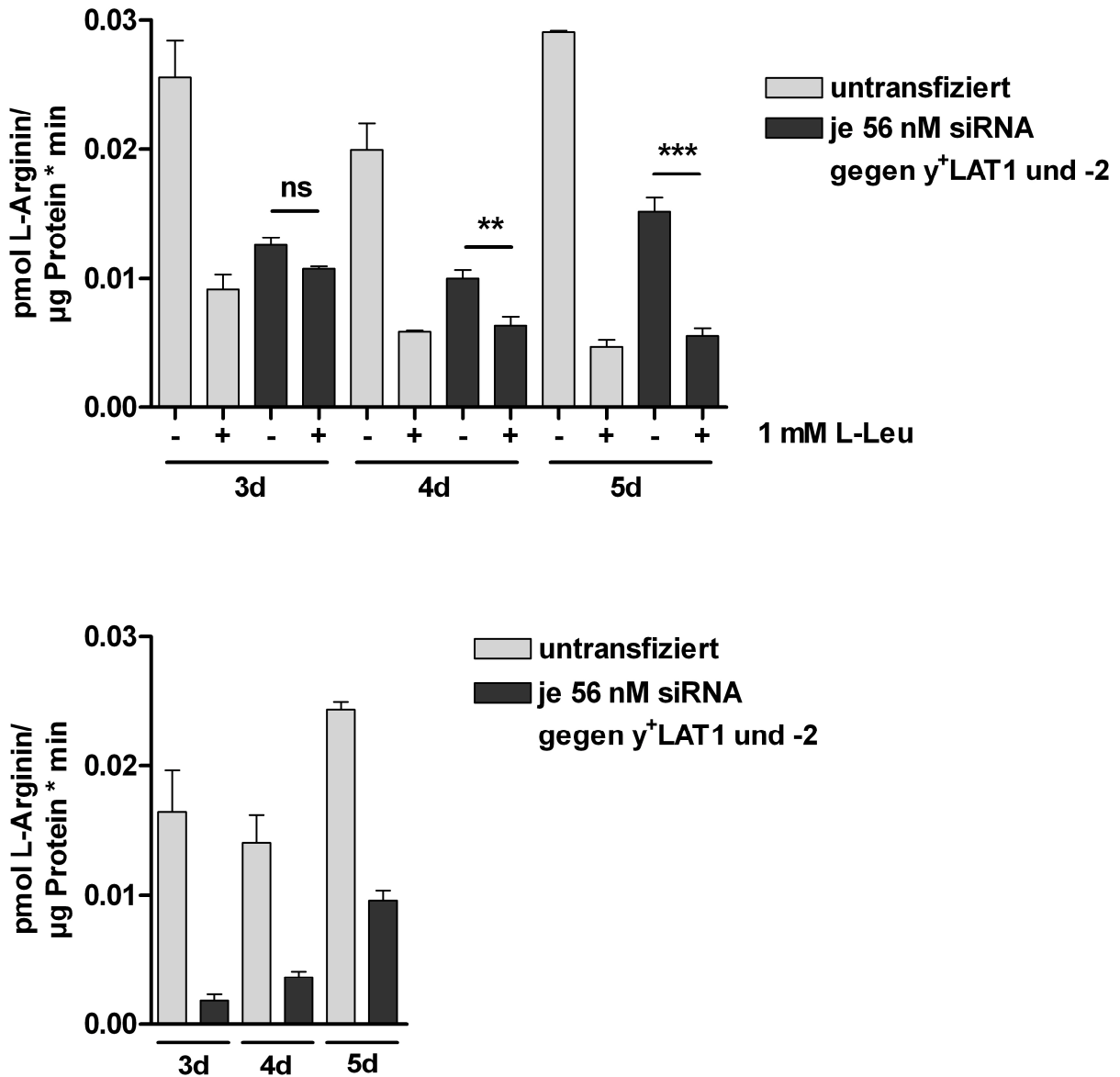


Abb. 16: Test auf den Zeitpunkt der minimalen Proteinaktivität nach Transfektion mit siRNA. In 6 Loch-Platten wurden EA.hy926-Zellen mit je 56 nM siRNA gegen γ^+ LAT1 und -2 und 13,5 nmol des Transfektionsmittels Saint Red (Synvolux, Groningen, NL) pro Loch transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen auf 96 Loch-Platten gesät und einen (3d), zwei (4d) oder drei (5d) weitere Tage später erfolgte eine $[^3\text{H}]$ -L-Argininfluxmessung mit 10 μM Arginin und 5 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ -L-Arginin und 30 sek Transportzeit in An- (+) oder Abwesenheit (-) von 1 mM L-Leucin. Nach 3-maligem Waschen der Zellen in eiskalter LL wurden diese lysiert und im β -Counter auf die importierte $[^3\text{H}]$ -L-Argininmenge analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 4.

Der untere Graph zeigt den Effekt, den die siRNA-Transfektion auf die γ^+ LAT-Aktivität hat (dunkel) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (hell). Er wurde über die Subtraktion des Leucin-vermittelten vom jeweiligen Gesamttransport ermittelt.

3.5.2 Einzelne Herunterregulation der Isoformen y^+ LAT1 und y^+ LAT2

Nachdem das Protokoll zur Transfektion optimiert und jenes des Transportversuchs validiert wurde, folgte eine Bestimmung der Bedeutung der einzelnen y^+ LAT-Isoformen für die Transportaktivität in EA.hy926-Zellen. Dafür wurden EA.hy926-Zellen mit 56 nM siRNA gegen jeweils eine Isoform und 56 nM non target-siRNA als Kontrolle mit jeweils 13,5 nmol Saint-Red pro Loch transfiziert. Drei Tage später erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen zur Durchführung einer qRT-PCR und Kontrolle der Effektivität der Transfektion auf Expressionsebene; weiterhin erfolgte ein Transportversuch mit [3 H]-L-Arginin, um den Anteil jeder Isoform an der Transportkapazität zu bestimmen.

Die Abbildung 17 zeigt in den oberen beiden Graphen die Expression von y^+ LAT1 und -2 nach Transfektion mit siRNA gegen y^+ LAT2. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich der Anteil an y^+ LAT2 nur in den Zellen auf eine Restmenge von 29 % signifikant verringerte, die auch mit siRNA gegen y^+ LAT2 behandelt wurden, die Expression von y^+ LAT1 hingegen blieb in allen unterschiedlich behandelten Gruppen unbeeinflusst. Analog verhält sich die mRNA-Expression nach Transfektion mit siRNA gegen y^+ LAT1 (untere Graphen): die Expression von y^+ LAT1 verringert sich signifikant auf eine Restmenge von 20 %, diejenige von y^+ LAT2 bleibt unbeeinflusst.

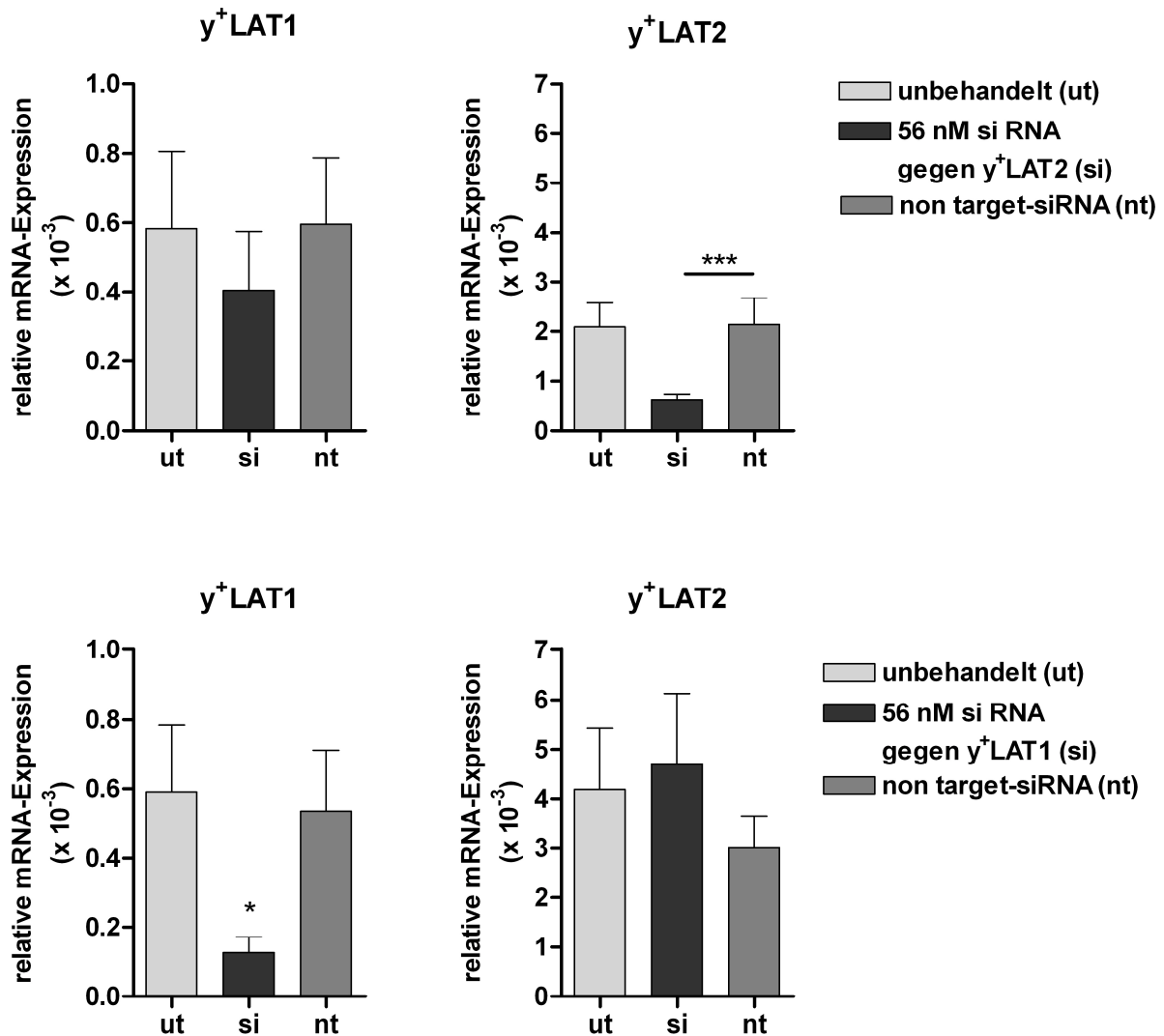


Abb. 17: Effekt der Herunterregulation der einzelnen Isoformen von y⁺LAT auf deren RNA-Expressionen. EA.hy926-Zellen wurden auf 6 Loch-Platten gegen jeweils eine Isoform des y⁺LAT mit jeweils 56 nM siRNA und 13,5 nmol Saint Red pro Loch transfiziert. Drei Tage später wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Es folgte eine qRT-PCR, deren Ergebnis jeweils auf die Expression der als Referenzgen benutzten GAPDH bezogen wurde. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 7-8 aus 3 Zellchargen, die statistische Analyse wurde mit dem two way-ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni-post hoc-Test durchgeführt.

Zugleich wurde eine Überprüfung der Expression der DDAH-Isoformen durchgeführt (Abb. 18). Diese veränderten sich im Vergleich mit unbehandelten oder mit non target-siRNA behandelten nicht, gleichgültig ob die EA.hy926-Zellen mit siRNA gegen y⁺LAT2 (oben) oder gegen y⁺LAT1 (unten) behandelt wurden.

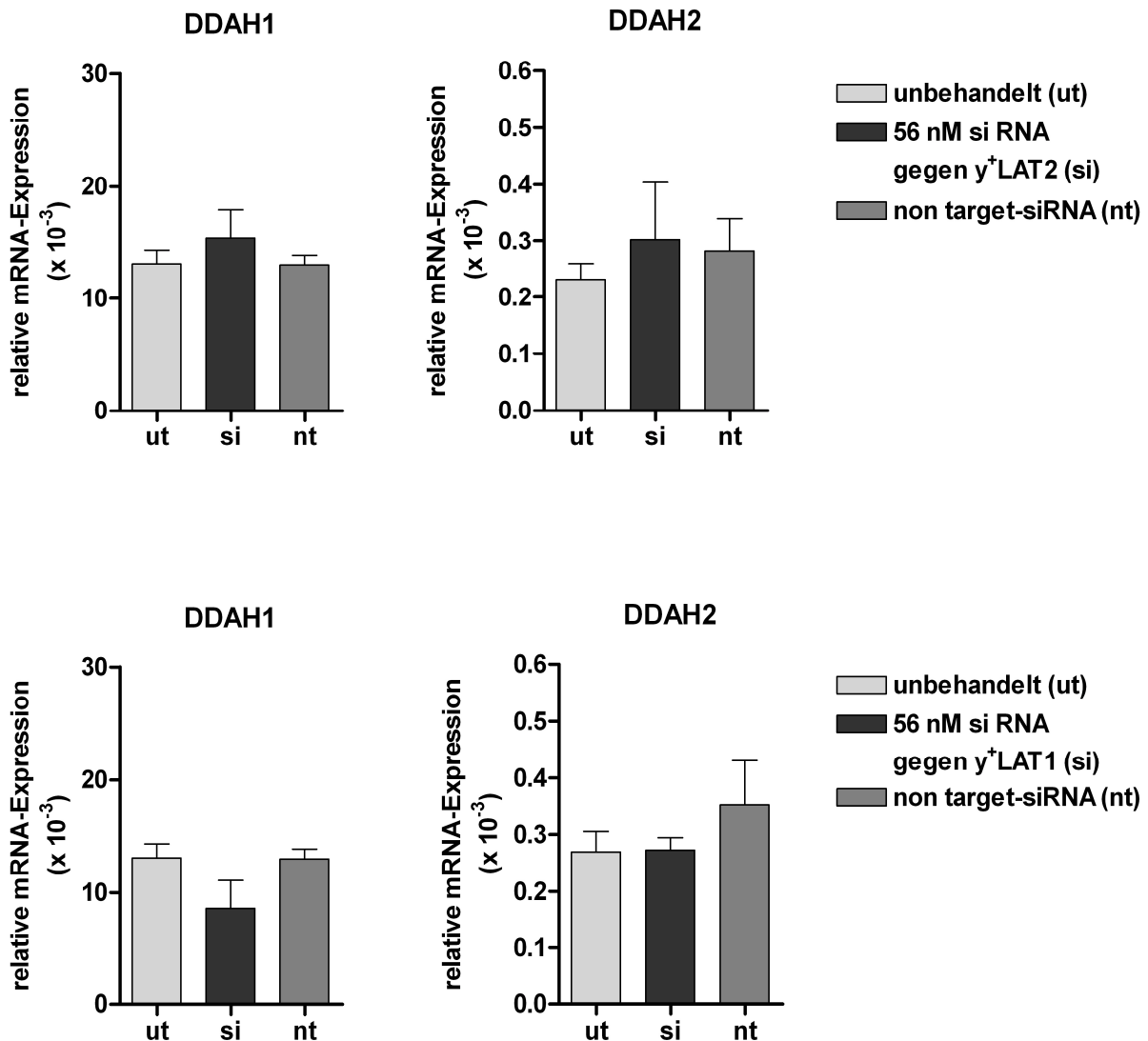


Abb. 18: Effekt der Herunterregulation der einzelnen Isoformen von y⁺LAT auf die RNA-Expressionen der DDAH-Isoformen. EA.hy926-Zellen wurden wie in Abb. 17 beschrieben behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 5-8 aus 4 Zellchargen.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die radioaktiven Transportversuche, die mit EA.hy926-Zellen nach Herunterregulation von y⁺LAT2 und y⁺LAT1 durchgeführt wurden. Die Säulen der Abbildungen sind jeweils in Triplets aufgeteilt, die den Anteil eines jeden Transportsystems aufzeigen: das erste Triplet zeigt den Totalimport des [³H]-L-Arginins, das zweite den darin enthaltenen Anteil an y⁺- oder CAT-vermittelten Transports, der durch eine gleichzeitige Applikation mit 1 mM L-Leucin bestimmt wurde. Im Überschuss zugegeben hemmt die neutrale Aminosäure das System y⁺L und lässt nur den y⁺-vermittelten Anteil sichtbar. Das dritte Triplet zeigt den im Gesamttransport enthaltenen Anteil an y⁺L-vermitteltem Argininimport, der durch eine 15-minütige Vorinkubation mit dem y⁺L-spezifischen Inhibitor N-Ethylmaleimid

bestimmt werden konnte. Das letzte Tripletts beider Abbildungen zeigt einen basalen, durch Zugabe beider Inhibitoren erzielten Flux.

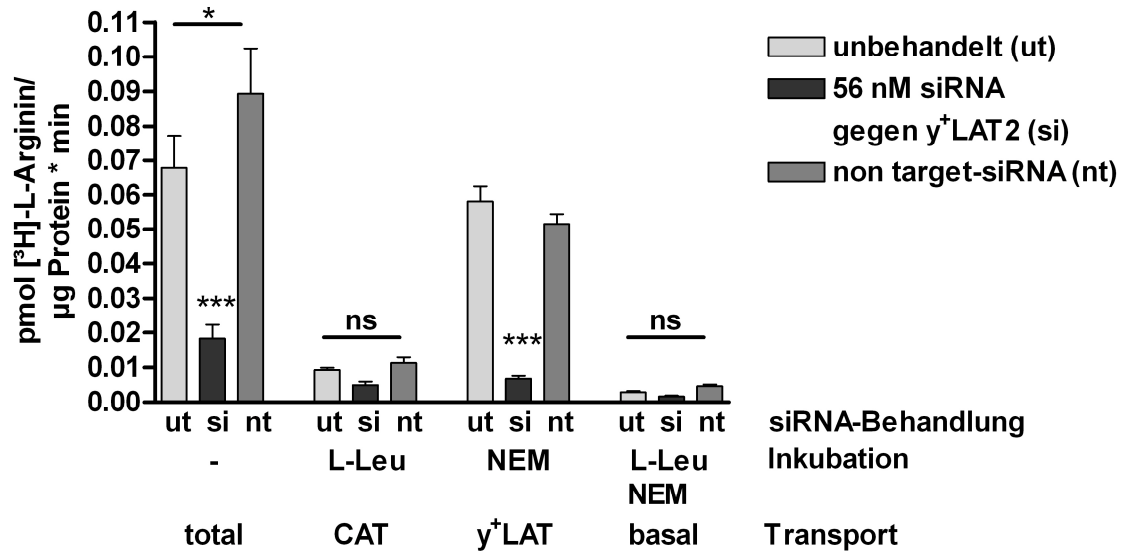


Abb. 19: Effekt der Herunterregulation von y+LAT2 auf seine Proteinexpression. EA.hy926-Zellen wurden auf 6 Loch-Platten mit 56 nM siRNA gegen y+LAT2 mit 13,5 nmol Saint Red pro Loch transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen auf 96 Loch-Platten gesät und einen weiteren Tag später erfolgte eine [3H]-L-Argininfluxmessung nach 30 sek. Transportzeit. Nach 3-maligem Waschen der Zellen in eiskalter LL wurden diese lysiert und im β-Counter auf die importierte [3H]-L-Argininmenge analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 12 aus 2 Zellchargen.

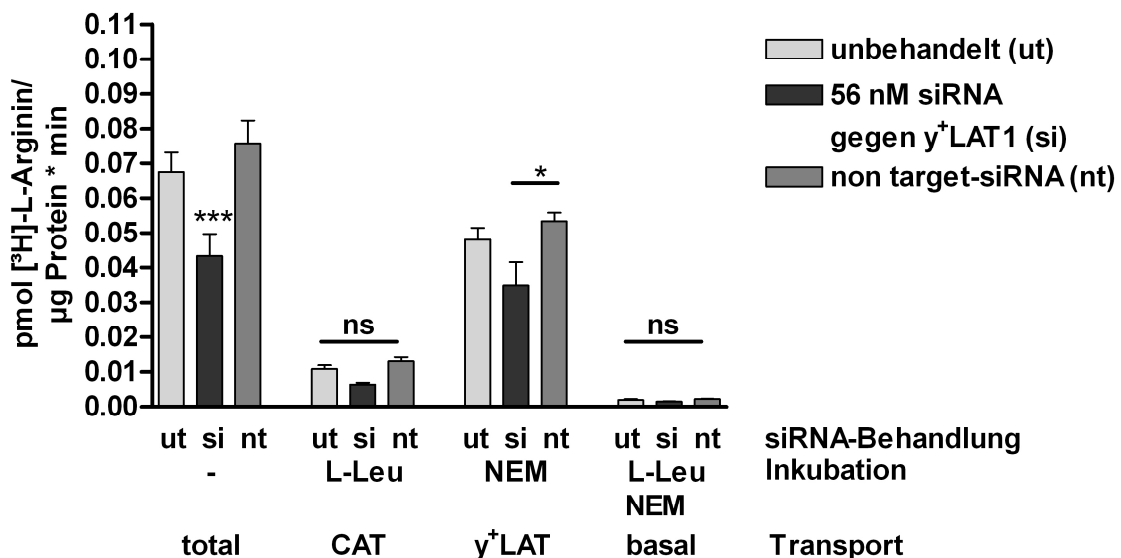


Abb. 20: Effekt der Herunterregulation von y+LAT1 auf seine Proteinexpression. EA.hy926-Zellen wurden auf 6 Loch-Platten mit 56 nM siRNA gegen y+LAT1 mit 13,5 nmol Saint Red pro Loch transfiziert und weiter wie in Abb. 19 behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 12 aus 2 Zellchargen.

In beiden Abbildungen ist gut zu erkennen, dass sich der Gesamtimport an [³H]-L-Arginin nur nach Behandlung mit siRNA signifikant verringerte. Dies war ein Resultat der verringerten Bildung von y⁺LAT2, beziehungsweise von y⁺LAT1 nach der entsprechenden Herunterregulation: bei Herunterregulation von y⁺LAT2 verringerte sich die Aktivität des Gesamtimportes um 0,05 pmol [³H]-L-Arginin/μg Protein * min, also auf eine Restaktivität von 26 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Restaktivität des y⁺LAT-vermittelten Transportes betrug 12 %, das heißt dass eine Herunterregulation der Isoform y⁺LAT2 eine Verminderung der Transportaktivität um 88 % bedingte und die restliche Transportaktivität hauptsächlich durch die Aktivität der Isoform y⁺LAT1 vermittelt werden musste. Auf der anderen Seite hatte die siRNA-vermittelte Hemmung der Translation von y⁺LAT1 eine weniger beeindruckende Wirkung: die Gesamttransportaktivität verringert sich um 0,03 pmol [³H]-L-Arginin/μg Protein * min, also auf eine Restaktivität von 64 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, was in einer y⁺LAT-vermittelten Reduktion um 27 % begründet war. In diesem Fall vermittelte nun die Isoform y⁺LAT2 den größten Anteil der übrigen Transportaktivität, der noch 73 % betrug. Der Anteil an CAT-vermitteltem Transport veränderte sich in den unterschiedlich behandelten Gruppen nicht signifikant, was einen Beitrag zum verringerten Gesamttransport ausschloss.

Die Tatsache, dass nach Behandlung mit siRNA gegen y⁺LAT2 ein insgesamt höherer Anteil am y⁺L-vermittelten und am Gesamttransport gehemmt wurde als nach Behandlung mit siRNA gegen y⁺LAT1, spiegelte die allgemeine Expression der beiden Transporter in EA.hy926-Zellen wieder: in Abb. 5 konnte bereits gezeigt werden, dass y⁺LAT2 in EA.hy926-Zellen mit der 13-fachen Expression von y⁺LAT1 die dominantere Isoform darstellte. Hier scheint also zu gelten, dass dort, wo sich relativ mehr mRNA befand, auch mehr zerstört werden konnte.

3.5.3 Simultane Herunterregulation von y^+ LAT1 und y^+ LAT2

Da sich der Einfluss der beiden Isoformen von y^+ LAT auf die gesamte Transportaktivität des Systems immens unterschied (siehe Abb. 19 und 20), wurden nun beide Isoformen simultan durch Behandlung mit siRNA in ihrer Translation gehemmt. Dann sollte der spezifische Einfluss des Systems y^+ L auf den ADMA-Export durch ein Akkumulationsexperiment untersucht werden.

Hierzu wurden EA.hy926-Zellen mit 13,5 nmol Saint-Red und 56 nM siRNA gegen jeweils y^+ LAT1 und -2 oder 112 nM non target-siRNA transfiziert oder unbehandelt belassen. Drei Tage nach Transfektion wurde aus einem Teil der Zellen die Gesamt-RNA isoliert und die Herunterregulation auf Expressionsebene mit einer qRT-PCR verifiziert. Ein anderer Teil der Zellen wurde einer radioaktiven Aufnahme unterzogen, um die Abnahme des Proteins zu zeigen. Ein weiterer Teil der Zellen diente dem Nachweis der intrazellulären ADMA-Akkumulation bei Reduzierung der y^+ LAT-Funktion.

Die quantitative real time-PCR ergab eine Herabsetzung des mRNA-Anteils von 17,5 % bei y^+ LAT1 und 20,2 % von y^+ LAT2 im Vergleich zu der mRNA-Menge, die in den non target-siRNA-Zellen gefunden wurde (Abb. 21).

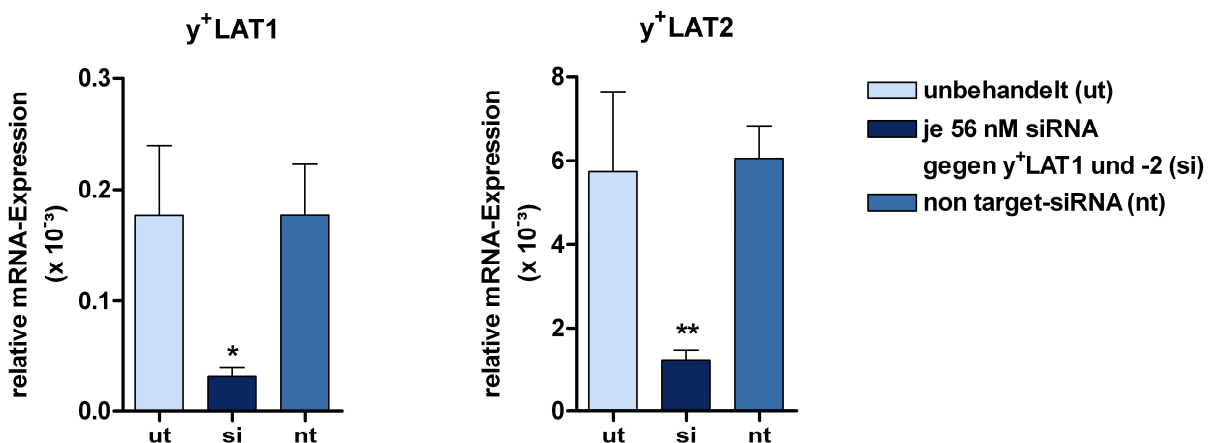


Abb. 21: RNA-Expression nach Herunterregulation beider Isoformen von y^+ LAT.

EA.hy926-Zellen wurden auf 6 Loch-Platten mit jeweils 56 nM siRNA gegen beide Isoformen von y^+ LAT (si, dunkelblau) und 13,5 nmol Saint Red pro Loch transfiziert; zusätzlich wurden unbehandelte Zellen (ut, hellblau) und mit 112 nM non target-siRNA transfizierte Zellen (nt, blau) mitgeführt. Drei Tage später wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Es folgte eine qRT-PCR, deren Ergebnis jeweils auf die Expression der als Referenzgen benutzten GAPDH bezogen wurde. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 4 aus 2 Zellchargen, die statistische Analyse wurde mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt.

Auch der Nachweis der Proteinminderung über die radioaktive Aufnahme zeigte eine Verringerung des Gesamttransports in siRNA-transfizierten Zellen um 50 % (Abb. 22). Diese nur in γ^+ LAT-herunterregulierten Zellen vorkommende Transportabnahme resultierte nicht aus einer Minderung des CAT-vermittelten Transports, der in allen Behandlungsgruppen gleich war. Das dritte Triplet der Abbildung 22 verdeutlicht, dass nur die γ^+ LAT-herunterregulierten Zellen eine signifikante Verringerung der γ^+ LAT-vermittelten Transportaktivität zeigten, die sich auf den Gesamttransport auswirkte. Dies war der Nachweis einer signifikanten Reduktion des γ^+ LAT-Proteins nach Herunterregulation mit siRNA.

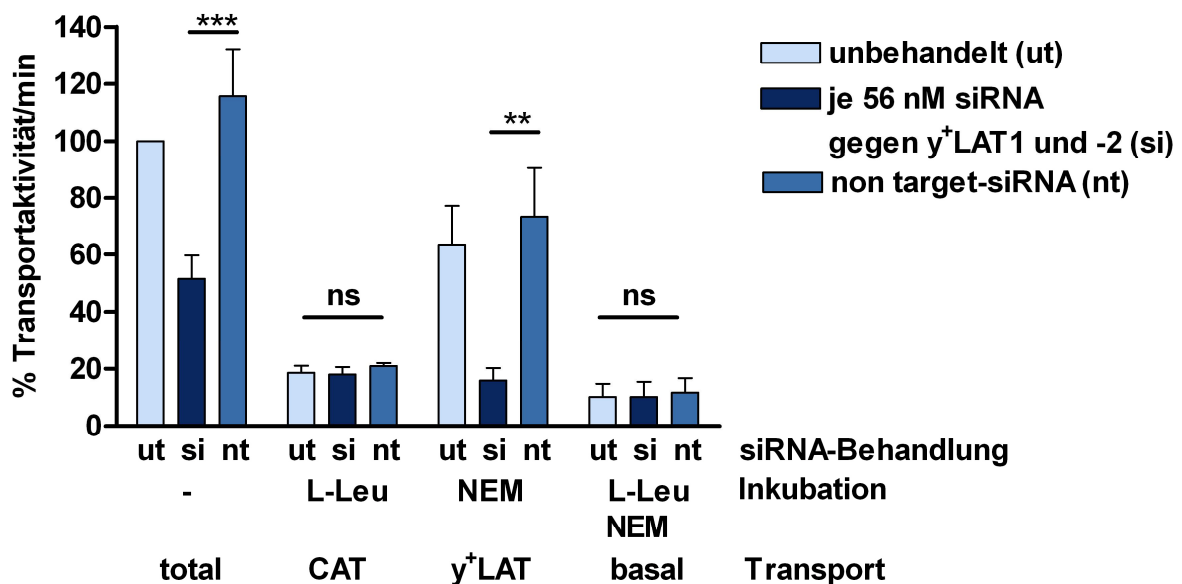


Abb. 22: Proteinexpression nach Herunterregulation beider Isoformen von γ^+ LAT. EA.hy926-Zellen wurden wie für Abb. 21 beschrieben transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen auf 96 Loch-Platten umgesät und einen weiteren Tag später erfolgte eine $[^3\text{H}]$ -L-Arginininfluxmessung mit 30 sek Transportzeit. Nach 3-maligem Waschen der Zellen in eiskalter LL wurden diese lysiert und im β -Counter auf die importierte $[^3\text{H}]$ -L-Argininmenge analysiert. Angegeben sind die relativen Mittelwerte \pm SEM, n = 30 aus 5 Zellchargen bezogen auf den $[^3\text{H}]$ -L-Arginininflux von unbehandelten Zellen (ut).

Der dritte Teil der transfizierten Zellen sollte nun Aufschluss darüber geben, ob das System γ^+ L den maßgeblichen Anteil am ADMA-Export einer Endothelzelle trägt. Hierfür wurden die Zellen zunächst gewaschen und depletiert, um die Zellen von endogenen Aminosäuren zu entleeren. Dann wurden diese 90 min lang in LL ohne Natrium inkubiert, um das in dieser Zeit endogen gebildete ADMA intrazellulär

anzureichern. Den Zellen wurde nach Ablauf der Inkubationszeit 5 min lang entweder LL mit Natrium und 1 mM L-Leucin zugegeben, um das System y^+L mit extrazellulärem Austauschsubstrat zu versorgen und den ADMA-Export zu erlauben (Abb. 23, +), oder die Zellen wurden weiterhin mit LL ohne Natrium inkubiert, um einen Einblick in die intrazellulären ADMA-Spiegel nach 90 min Akkumulation zu bekommen (Abb. 23, -). Die Lysate und die Extrazellulärpuffer wurden anschließend in der HPLC auf die ADMA-Konzentration hin analysiert, die jeweils die intra- und extrazellulären Verhältnisse belegte. In Abbildung 23 stellen die Farben weiterhin die Behandlung der Zellen dar, der karierte Anteil zeigt die intrazelluläre, der ungemusterte Anteil die extrazelluläre ADMA-Konzentration an. Man kann daraus ersehen, dass sich bei einer Restriktion des ADMA-Exports durch Entzug eines extrazellulären Austauschsubstrates in allen unterschiedlich behandelten Gruppen 11,8 – 13,3 μM ADMA in den Endothelzellen befand und nur ein geringer Anteil im Extrazellulärmedium. Wurde allerdings nach 90-minütiger endogener ADMA-Akkumulation für 5 min ein Austauschsubstrat angeboten, reagierten die Endothelzellen mit ADMA-Export: die intrazelluläre ADMA-Konzentration bei den unbehandelten und den non target-siRNA-Zellen sank auf 5,3 bzw. 6,4 μM ADMA, weswegen sich dort nach dem Export eine extrazelluläre ADMA-Konzentration von 11,6 bzw. 9,3 μM fand. Ein anderes Bild zeigten die Zellen, die mit siRNA gegen y^+LAT behandelt wurden: aufgrund der Reduzierung des Proteins, die bereits im Transportversuch (Abb. 22) bewiesen werden konnte, war bei diesen Endothelzellen der ADMA-Export signifikant verringert. Es fand sich nach 5-minütiger Inkubation mit Austauschsubstrat immer noch $10,4 \pm 1,234$ μM ADMA im Lysat, also in den Endothelzellen und nur $4,1 \pm 1,083$ μM ADMA im Extrazellulärmedium.

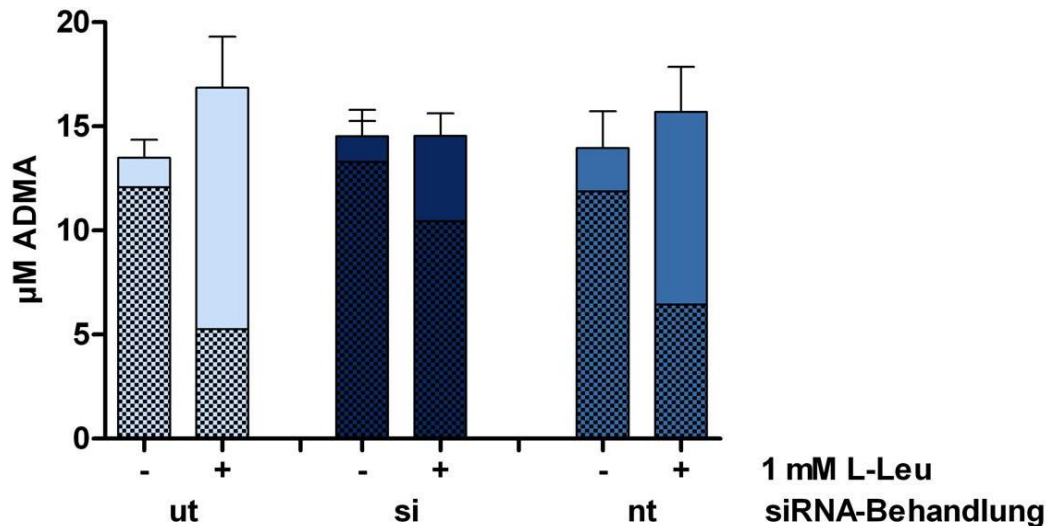


Abb. 23: Intra- und extrazelluläre ADMA-Konzentrationen nach Herunterregulation von System γ^L in EA.hy926-Zellen. EA.hy926-Zellen wurden wie für Abb. 21 beschrieben transfiziert. Drei Tage später wurde zunächst 3x mit eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen, dann mit derselben Lösung für 30 min depletiert (mit einem Mediumwechsel alle 10 min) und 90 min das endogen gebildete ADMA mit LL ohne Na^+ akkumuliert. Danach wurden die Zellen 5 min lang entweder mit LL ohne Na^+ (-) oder mit LL mit Na^+ und 1 mM L-Leucin (+) inkubiert. Zuletzt wurde der Extrazellularpuffer abgenommen, die Zellen 2x mit eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen und mit 70% Ethanol lysiert. Lysate (kariert) und Extrazellularpuffer (nicht gemustert) wurden in der HPLC analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$ aus 3 Zellchargen.

3.5.4 Simultane Herunterregulation von γ^+ LAT1 und -2 in primären HUVECs

Nun sollte auch die Bedeutung von γ^+ LAT für den ADMA-Export in primären Endothelzellen determiniert werden. Zur Verifizierung der Abnahme des Proteins nach der Transfektion mit siRNA gegen γ^+ LAT wurden abermals Aufnahmeversuche mit radioaktivem [3 H]-L-Arginin durchgeführt (Abb. 24). Dabei zeigte sich eine Abnahme der gesamten Transportaktivität der γ^+ LAT-herunterregulierten Zellen auf 53 % verglichen mit der Transportaktivität der non target-siRNA-behandelten Zellen. Abermals resultierte diese Transportverringering nur aus einer Reduktion des γ^+ LAT-Anteils am Gesamttransport.

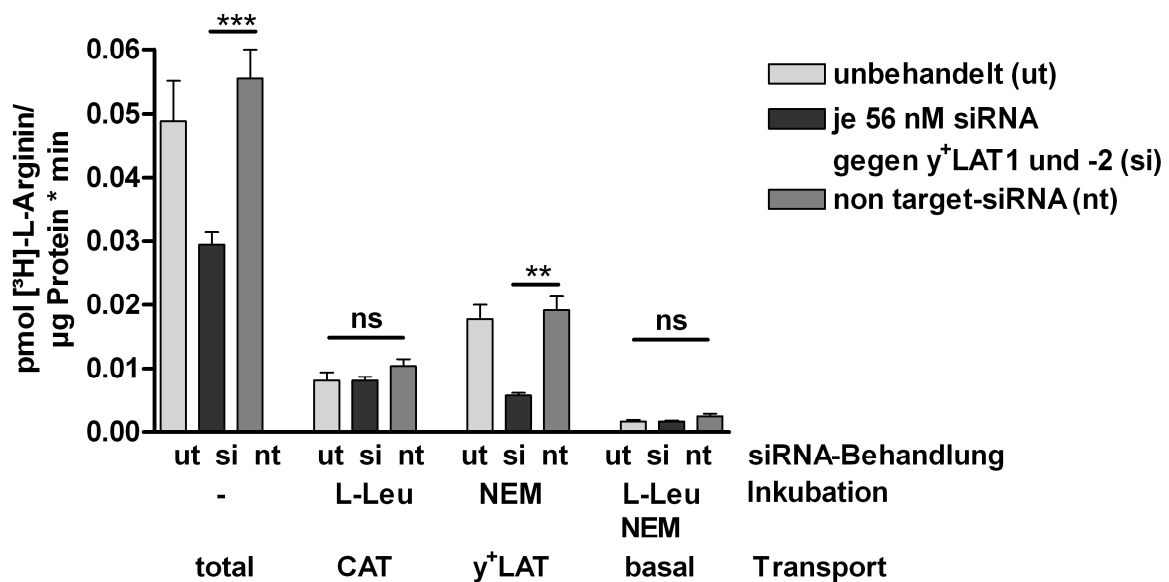


Abb. 24: Proteinexpression nach Herunterregulation beider Isoformen von γ^+ LAT in HUVECs. HUVECs wurden wie für Abb. 21 beschrieben transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen auf 96 Loch-Platten umgesät und einen weiteren Tag später erfolgte eine [3 H]-L-Arginininfluxmessung mit 30 sek Transportzeit. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 16 aus 3 Zellchargen.

Aufgrund der geringen Anzahl an Zellen, die nach einer HUVEC-Isolation zur Verfügung stehen, der langsameren Wachstumsrate im Vergleich zu der immortalisierten EA.hy926-Linie und der daraus resultierenden beschränkten Zellzahl konnten nicht genügend HUVECs aus einer Nabelschnur gewonnen werden, um auch einen Akkumulationsversuch wie in Kapitel 3.3 (Abb. 10) mit γ^+ LAT-herunterregulierten HUVECs durchzuführen.

3.6 NO-Produktion

Es war durch Blockade des Transporters gelungen, eine beträchtliche Menge an endogen produziertem ADMA intrazellulär zu akkumulieren. Da ADMA bei Studien mit isolierten NO-Synthasen als kompetitiver Inhibitor derselben agierte, sollte nun überprüft werden, ob dieses in der Endothelzelle akkumulierte ADMA auch in der intakten Zelle in der Lage ist, die endotheliale NO-Synthase bei der Produktion von bioaktivem NO zu hemmen.

3.6.1 Verifizierung des Radioimmunoassays

Ziel dieses Tests ist es, bioaktives NO mit Hilfe von Reporterzellen zu detektieren, in diesem Fall fötale Rattenlungenfibroblastenzellen (RFL-6). Diese produzieren abhängig von der produzierten NO-Menge den second messenger cGMP, der über einen Radioimmunoassay detektiert werden kann. Für diesen Radioimmunoassay werden Lysate aus den RFL-6 Zellen mit radioaktiv markiertem cGMP (^{125}I -cGMP) und einem Antikörper gegen cGMP inkubiert. Es kommt zur Bildung von Antikörper-cGMP-Komplexen, deren Gehalt an radioaktiv markiertem cGMP bestimmt werden kann: je mehr Radioaktivität in einer Probe detektiert wird, desto weniger endogen gebildetes cGMP war darin und desto weniger NO wurde von den NO-produzierenden Zellen gebildet. Umgekehrt findet sich weniger Radioaktivität bei viel endogen gebildetem cGMP und umso mehr bioaktives NO stammte ursprünglich von den NO-produzierenden Zellen.

- Minimal- und Maximalproduktion der RFL-6-Zellen

Zunächst sollte die Kapazität der Reporterzellen aufgeklärt werden. Hierzu wurden RFL-6 bis zur Konfluenz auf 24 Loch-Platten kultiviert und gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in LL, IBMX und SOD. Weitere 2 min wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit dem NO-Donor SIN-1 in der Lösung inkubiert, was zur Ermittlung der maximal möglichen cGMP-Bildung der RFL-6 diente. Abbildung 25 zeigt, dass die maximale cGMP-Produktion der Reporterzellen bei $0,098 \pm 0,018$ pmol cGMP/ μg Protein lag, die minimale cGMP-Produktion ohne jegliche Stimuli lag

bei $0,006 \pm 0,0002$ pmol cGMP/ μ g Protein. Die RFL-6-Reporterzellen zeigten damit eine 16-fache Stimulation der cGMP-Produktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Dieses Ergebnis erreichte nicht die cGMP-Produktion, die Ishii et al. bereits für NO-stimulierte RFL-6-Zellen publizierten, stellte aber einen deutlichen Unterschied zwischen Stimulation und Basalwert dar (Ishii, Sheng, Warner, Förstermann, and Murad, 1991).

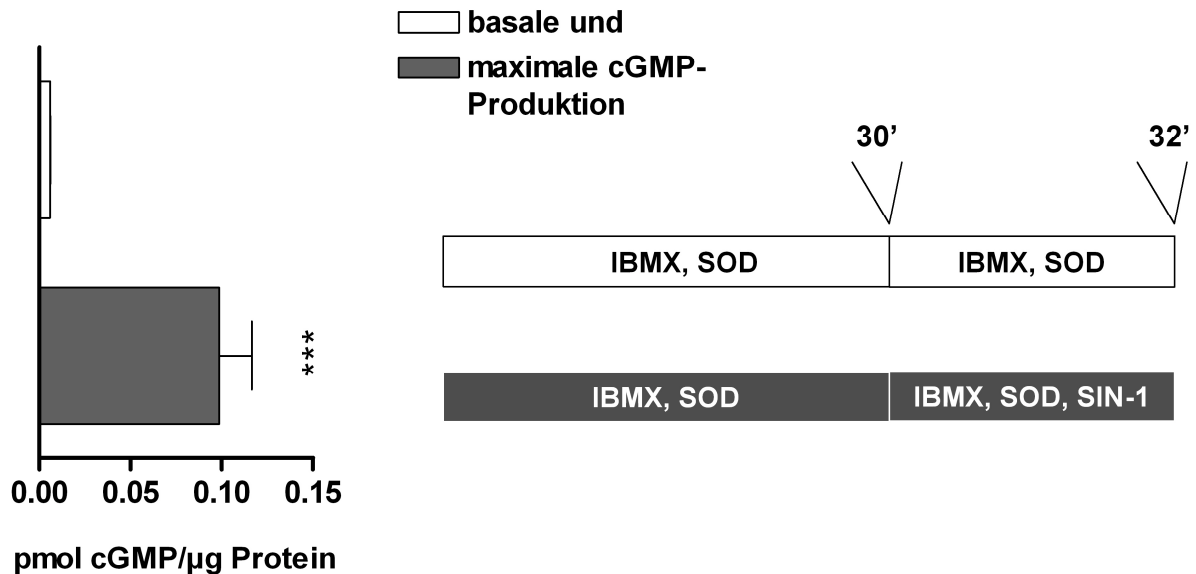


Abb. 25: Basale und maximale cGMP-Produktion in RFL-6-Zellen. Konfluente RFL-6-Zellen in 24 Loch-Platten wurden 3x mit 300 μ l eiskalter LL gewaschen und 30 min in LL mit 600 μ M IBMX inkubiert. Alle Lösungen enthielten auch 200 U/ml SOD. Dann wurde 2 min lang mit derselben Lösung, die zusätzlich 200 U/ml SOD enthielt, die basale cGMP-Produktion (hell) und mit derselben Lösung mit 1 μ M SIN-1 die maximale cGMP-Produktion (dunkel) initiiert. Diese wurden zügig abgesaugt und die Zellen mit je 100 μ l Natriumacetat (pH 4) lysiert, mit flüssigem Stickstoff übergossen und im Radioimmunoassay auf das gebildete cGMP analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 4.

- Kalziumabhängigkeit der Endothelzellen

Weiterhin sollte die Kalziumabhängigkeit der NO-bildenden Zellen, in diesem Fall der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926, verifiziert werden (Abb. 26). Hierfür wurden konfluente EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten gewaschen und depletiert, weiterhin enthielt die Lösung 200 U/ml SOD. Danach wurde den Zellen 2 min lang dieselbe Lösung, die dann zusätzlich 600 μ M IBMX enthielt, gegeben. Die Lösung war zudem entweder ohne oder mit 10 μ M Kalzium-Ionophor A23187 versetzt. Nach dieser 2-minütigen Stimulation der NO-Produktion wurde der Extrazellulärpuffer auf

die RFL-6-Zellen, die zuvor 3x mit LL gewaschen und 30 min mit 600 μ M IBMX inkubiert wurden, überführt. Aus der Abbildung 26 ist erkennbar, dass die Produktion bioaktiven Stickstoffs durch die EA.hy926-Zellen Kalzium-sensitiv ist, da die gemessene cGMP-Menge nur bei Stimulation mit Kalzium-Ionophor bei $0,086 \pm 0,005$ pmol cGMP/ μ g Protein lag. Ohne das zugesetzte Kalzium-Ionophor lag der Wert bei $0,011 \pm 0,0008$ pmol cGMP/ μ g Protein und damit um knapp 8-fach niedriger.

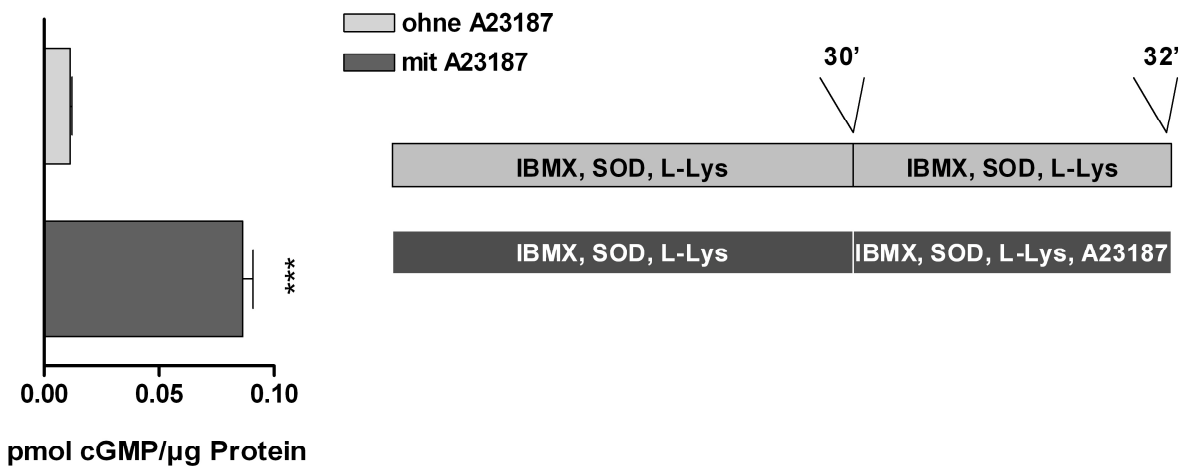


Abb. 26: Kalziumabhängigkeit der NO-Produktion durch die NO-Produzenten.

Konfluente EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten wurden 3x mit 300 μ l eiskalter LL gewaschen und 30 min in LL mit 1 mM L-Lysin und 200 U/ml SOD inkubiert (alle 10 min Mediumwechsel). Danach wurde 2 min lang mit denselben Lösungen, die zusätzlich noch 600 μ M IBMX enthielten und entweder ohne (hell) oder mit 10 μ M Ca-Ionophor (dunkel) versetzt waren, die cGMP-Produktion initiiert. Diese Lösungen wurden auf die RFL-6-Zellen, die zuvor 3x mit LL gewaschen und 30 min mit 600 μ M IBMX inkubiert wurden, überführt. Nach 2 min Inkubation bei 37° C wurden diese Lösungen zügig von den RFL-6-Zellen abgesaugt und diese mit je 100 μ l Natriumacetat (pH 4) lysiert, mit flüssigem Stickstoff übergossen und im Radioimmunoassay auf das gebildete cGMP analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 4.

Alle weiteren Experimente zur Bestimmung bioaktiven Stickstoffs wurden daher in den letzten 30 min vor dem Transfer durchgeführt wie in den beiden vorigen Abschnitten beschrieben: die NO-bildenden Zellen erhielten in den letzten 30 min 200 U/ml SOD in das Extrazellulärmedium, das alle 10 min gewechselt wurde. Während der Stimulation der NO-Bildung wurde zudem 2 min lang 600 μ M IBMX und 10 μ M Kalzium-Ionophor A23187 zugesetzt. Die Reporterzellen erhielten 30 min vor dem Transfer 200 U/ml SOD und 600 μ M IBMX. Die Basal- und Maximalaktivität der RFL-6-Zellen wurde für jeden Versuch mitbestimmt.

- Substratmangel durch Hemmung des Proteinabbaus

A. Simon stellte in ihrer Dissertation bereits fest, dass eine der Substratquellen der eNOS der intrazelluläre Proteinabbau ist, der unter anderem auch L-Arginin frei setzt, das die eNOS zur Synthese von NO nutzen kann. Zur Hemmung des Proteinabbaus wurde der Proteasominhibitor MG132 verwendet, endogene Aminosäuren wurden mit der basischen Aminosäure L-Lysin depletiert.

Konfluente EA.hy926-Zellen wurden gewaschen und für 30 min in LL mit 1 mM L-Lysin oder in derselben Lösung mit 1 mM L-Lysin und 1 μ M MG132 inkubiert. Danach wurde 2 min lang die cGMP-Produktion in den RFL-6-Zellen initiiert und gemessen. Die Auswertung ergab analog zu den Ergebnissen von A. Simon, dass die Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 eine um das 3-fache verminderte, zelluläre NO-Produktion im Vergleich zu Zellen mit funktionierendem Proteinabbau zeigte (Abb. 27).

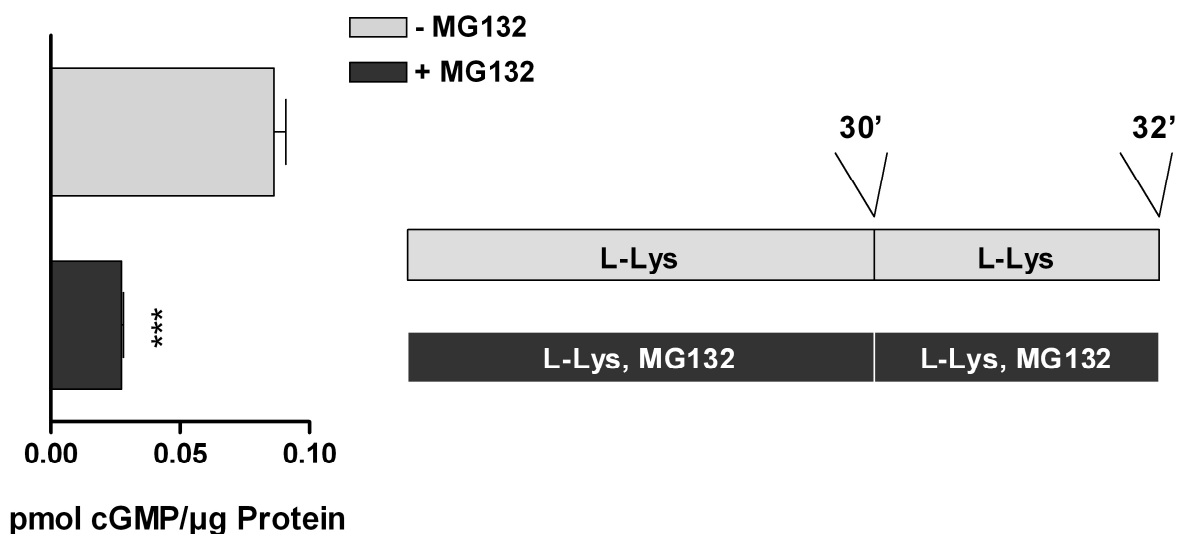


Abb. 27: Vergleich der cGMP-Produktion depletierter EA.hy926-Zellen zwischen funktionierendem und behindertem Proteinabbau. Konfluente EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten wurden 3x mit 300 μ l eiskalter LL gewaschen und 30 min in LL mit 1 mM L-Lysin (hell) oder in derselben Lösung mit 1 mM L-Lysin und 1 μ M MG132 depletiert (dunkel) (alle 10 min Mediumwechsel), alle Lösungen enthielten auch 200 U/ml SOD. Danach wurde 2 min lang mit denselben Lösungen, die zusätzlich noch 10 μ M Ca-Ionophor und 600 μ M IBMX enthielten, die cGMP-Produktion in den RFL-6-Zellen initiiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, n = 4.

3.6.2 Bedeutung des hCAT-1 für die NO-Produktion

Hier sollte geklärt werden, ob eine Depletion des eNOS-Substrates L-Arginin über den kationischen Aminosäuretransporter-1 (CAT) der EA.hy926 die NO-Produktion beeinflussen kann. Dazu wurde die Positivkontrolle, die die maximale NO-Produktion der Zellen zeigen sollte, durchgehend in LL mit Natrium mit 1 mM L-Arginin inkubiert, damit für die eNOS genügend Substrat zur NO-Produktion zur Verfügung stand. Weitere Zellen wurden zur Hemmung der Transporter 90 min in LL- Na^+ inkubiert, oder in LL- Na^+ mit 1 mM L-Lysin, damit diese Zellen vollkommen von endogenen Aminosäuren depletiert werden konnten. Bei den Transport-gehemmten Zellen wurde in den letzten 2 min 1 mM L-Lysin zugegeben, um Transport zuzulassen. Die Abbildung 28 zeigt im Vergleich zur Positivkontrolle, dass nach 90 min Transporterhemmung ein 2-minütiger Export von L-Arginin, das gegen das extrazellulär angebotene L-Lysin ausgetauscht wird, nicht genügte, um eine Verringerung der NO-Produktion zu erzielen (grau). Die innerhalb der 1,5 Stunden ständige Anwesenheit des Austauschsubstrates L-Lysin hingegen schien eine so starke L-Arginindepletion zu bewirken, dass die eNOS einen Substratmangel erleidete und eine signifikante Hemmung der NO-Synthese erfolgte (dunkel).

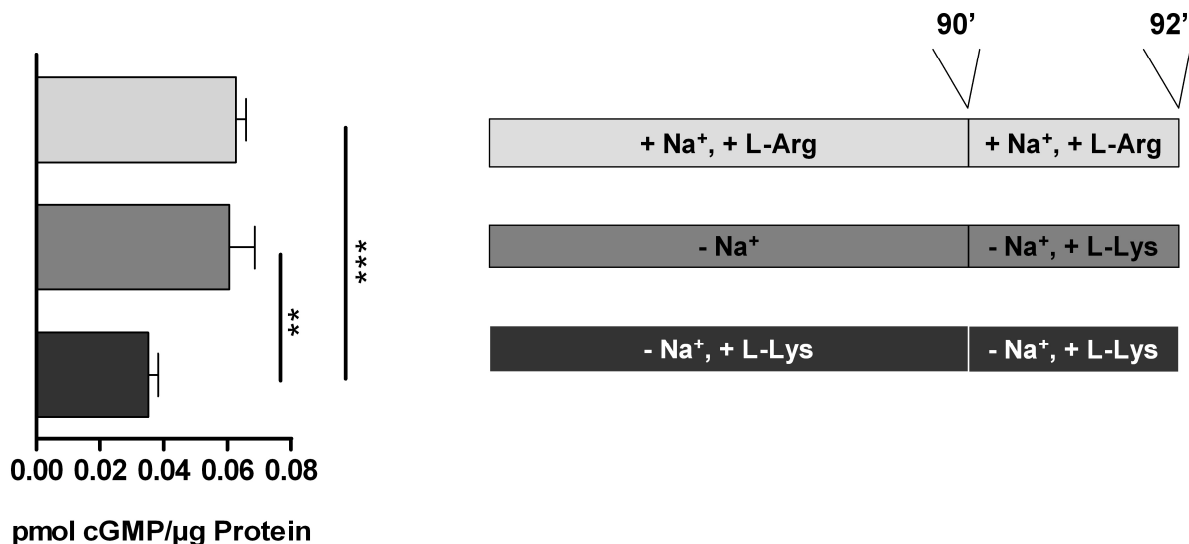


Abb. 28: Prüfung des Einflusses des CAT-vermittelten Transports auf die cGMP-Produktion in EA.hy926-Zellen. Konfluente EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten wurden 3x mit 500 μl eiskalter LL ohne Na^+ gewaschen und entweder 90 min in LL mit 1 mM L-Arginin (hell), 90 min in LL ohne Na^+ mit 1 mM L-Lysin (dunkel) oder 90 min in LL ohne Na^+ (grau) inkubiert. In den ersten 60 min erfolgte ein Mediumwechsel nach 30 min, in den letzten 30 min erfolgten alle 10 min Medienwechsel mit denselben Lösungen, die nun zusätzlich 200U/ml SOD enthielten. Die angegebenen Lösungen waren während der 2 min cGMP-Messung auf den Zellen und enthielten zusätzlich 10 μM Ca-Ionophor und 600 μM IBMX,

dabei wurden den zuvor in LL- Na⁺ inkubierten Zellen nun 1 mM L-Lysin zugesetzt (grau). Mit diesen Lösungen wurde die cGMP-Produktion in den RFL-6-Zellen initiiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 12 aus 3 Zellchargen.

Dies ist ein Ergebnis, das sich reziprok zu den Daten in der Dissertation von A. Simon beschriebenen verhält. A. Simon fand eine zeitabhängige Regeneration der eNOS-Aktivität: die NO-Produktion der EA.hy926-Endothelzellen zeigte ab einer Inkubationsdauer von 1 Stunde in 1 mM L-Lysin keinen signifikanten Unterschied zu der NO-Produktion der in L-Arginin-inkubierten Zellen. Im Zeitraum bis 1 h wurde eine Reduktion der NO-Produktion beobachtet (Dissertation A. Simon, Kapitel 3.1.1.3.1, Abb. 3.5). Der einzige Unterschied zu dem hier durchgeführten Experiment ist die Inkubation der Zellen in LL+Na⁺, die hier einer LL-Na⁺ weichen musste. Der Grund hierfür liegt in der späteren Untersuchung des Einflusses eines erhöhten intrazellulären ADMA-Spiegels auf die NO-Produktion, der durch Hemmung des Systems y⁺L erreicht werden sollte. Zur Hemmung der y⁺LATs ist eine Lösung ohne Aminosäuren und ohne Natrium erforderlich, da das System y⁺L auch einen Natrium-abhängigen Transport vermittelt. Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss des Natriumentzugs auf die endotheliale NO-Synthase untersucht.

3.6.3 Einfluss des Natriumentzugs auf die endotheliale NO-Synthase

Hier sollte nun der Einfluss eines Natriumentzugs auf die eNOS untersucht werden, da dieser zur intrazellulären ADMA-Akkumulation und anschließender Untersuchung der NO-Produktion wichtig ist. Zur Bestimmung der maximalen NO-Produktion wurde ein Teil der EA.hy926 während des gesamten Versuchs in LL mit Natrium und 1 mM L-Arginin inkubiert. Die anderen Zellen wurden 90 min in LL ohne Natrium mit 1 mM L-Arginin inkubiert. Die angegebenen Lösungen waren während der 2 min cGMP-Messung auf den Zellen, allerdings wurde bei einem Teil der zuvor in LL ohne Natrium inkubierten Zellen diese Lösung durch LL mit Natrium ersetzt. Die Abbildung 29 zeigt oben links die cGMP-Messung, die deutlich macht, dass nach 90 min Inkubation in LL ohne Natrium eine signifikante Hemmung der NO-Synthase auftrat. Allerdings normalisierte eine nachfolgende 2-minütige Zugabe von Natrium die NO-Produktion im Vergleich zur Positivkontrolle wieder. Die untere Hälfte der Abbildung

29 zeigt zudem die bei diesem Experiment vorherrschenden intrazellulären ADMA- und L-Argininkonzentrationen an, die sich in den unterschiedlich behandelten Zellen nicht unterschied. Dies wird in der angegebenen Tabelle, die das Arg/ADMA-Verhältnis darstellt, durch eine 2000-fach höhere Konzentration von intrazellulärem L-Arginin im Vergleich zu intrazellulärem ADMA unterstrichen.

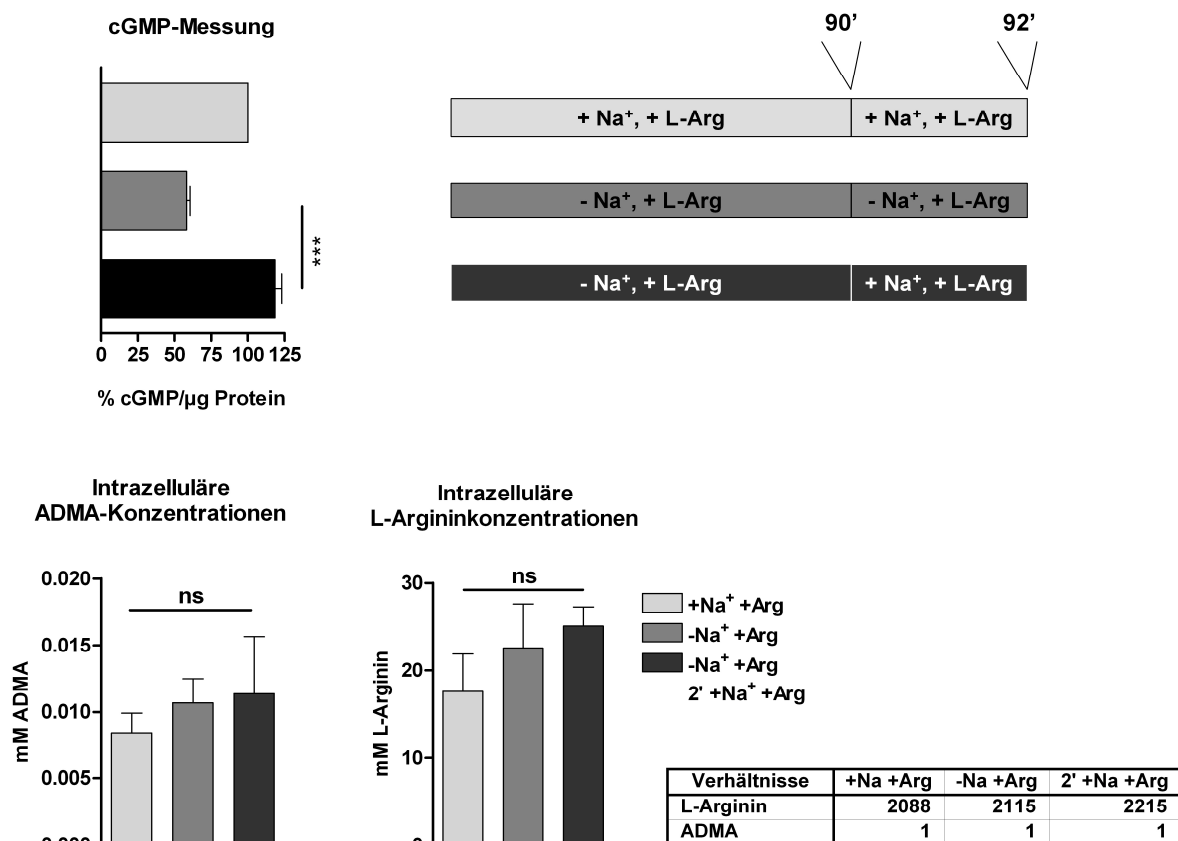


Abb. 29: Prüfung des Einflusses von Natrium auf die cGMP-Produktion in EA.hy926-Zellen. Konfluente EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten wurden 5x mit 500 μl eiskalter LL ohne Na⁺ gewaschen und entweder 90 min in LL mit 1 mM L-Arginin (hell) oder 90 min in LL ohne Na⁺ mit 1 mM L-Arginin (grau und dunkel) inkubiert. In den ersten 60 min erfolgte ein Mediumwechsel nach 30 min, in den letzten 30 min erfolgten alle 10 min Medienwechsel. Die angegebenen Lösungen waren während der 2 min cGMP-Messung auf den Zellen, allerdings wurden einem Teil der zuvor in LL ohne Na⁺ inkubierten Zellen LL mit Na⁺ und L-Arginin zugesetzt (dunkel). Die Graphik oben links zeigt die cGMP-Messung und rechts das Behandlungsschema der Zellen, die Graphik unten links die korrespondierenden intrazellulären ADMA-Konzentrationen und die unten rechts die L-Argininkonzentrationen, die jeweils per HPLC bestimmt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 8-12 aus 3 Zellchargen. Die Tabelle zeigt die per HPLC analysierten, intrazellulären Verhältnisse von L-Arginin zu ADMA an.

Nachdem nun geklärt war, dass eine kurzzeitige Zugabe von Natrium für die eNOS-Funktion essentiell und ausreichend ist, wurde der Versuch zum Einfluss von intrazellulär akkumuliertem ADMA unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis durchgeführt.

3.6.4 Einfluss von intrazellulär akkumuliertem asymmetrischen Dimethylarginin auf die endotheliale NO-Synthase

In Kapitel 3.3 und 3.4 bei der Transporterhemmung an immortalisierten EA.hy926 und an primären Endothelzellen wurde bereits gezeigt, dass bei Hemmung der Transporterfunktion durch Entzug von Aminosäuren als Austauschsubstrat eine zeitabhängige intrazelluläre Anreicherung von asymmetrischem Dimethylarginin erfolgt (Abb. 10 und 11). Da ADMA als kompetitiver Inhibitor isolierter NO-Synthasen gilt, sollte nun unter Transporter-gehemmten Bedingungen der Einfluss eines intrazellulär erhöhten ADMA-Spiegels auf die Produktion bioaktiven Stickstoffs *in vivo* bestimmt werden.

Dazu wurden konfluente EA.hy926-Zellen 90 min lang den ADMA-akkumulierenden Bedingungen ausgesetzt: sie wurden in LL ohne Natrium bei 37° C inkubiert. Danach folgt eine insgesamt 5-minütige Inkubation in LL mit Natrium und ohne Aminosäuren (zur Erhaltung des über die 1,5 h erzielten intrazellulären ADMA-Spiegels) oder in LL mit Natrium und 1 mM L-Leucin (hier wurde für 5 min der ADMA-Export über das System γ^+L erlaubt). Es wurde allerdings weiterhin nur 2 min lang die NO-Produktion durch Zugabe von Kalzium-Ionophor initiiert und gemessen (siehe Schema oben rechts in Abb. 30). Als Positivkontrolle dienten EA.hy926-Zellen, die die komplette Experimentdauer hindurch in LL mit Natrium mit 1 mM L-Arginin inkubiert wurden.

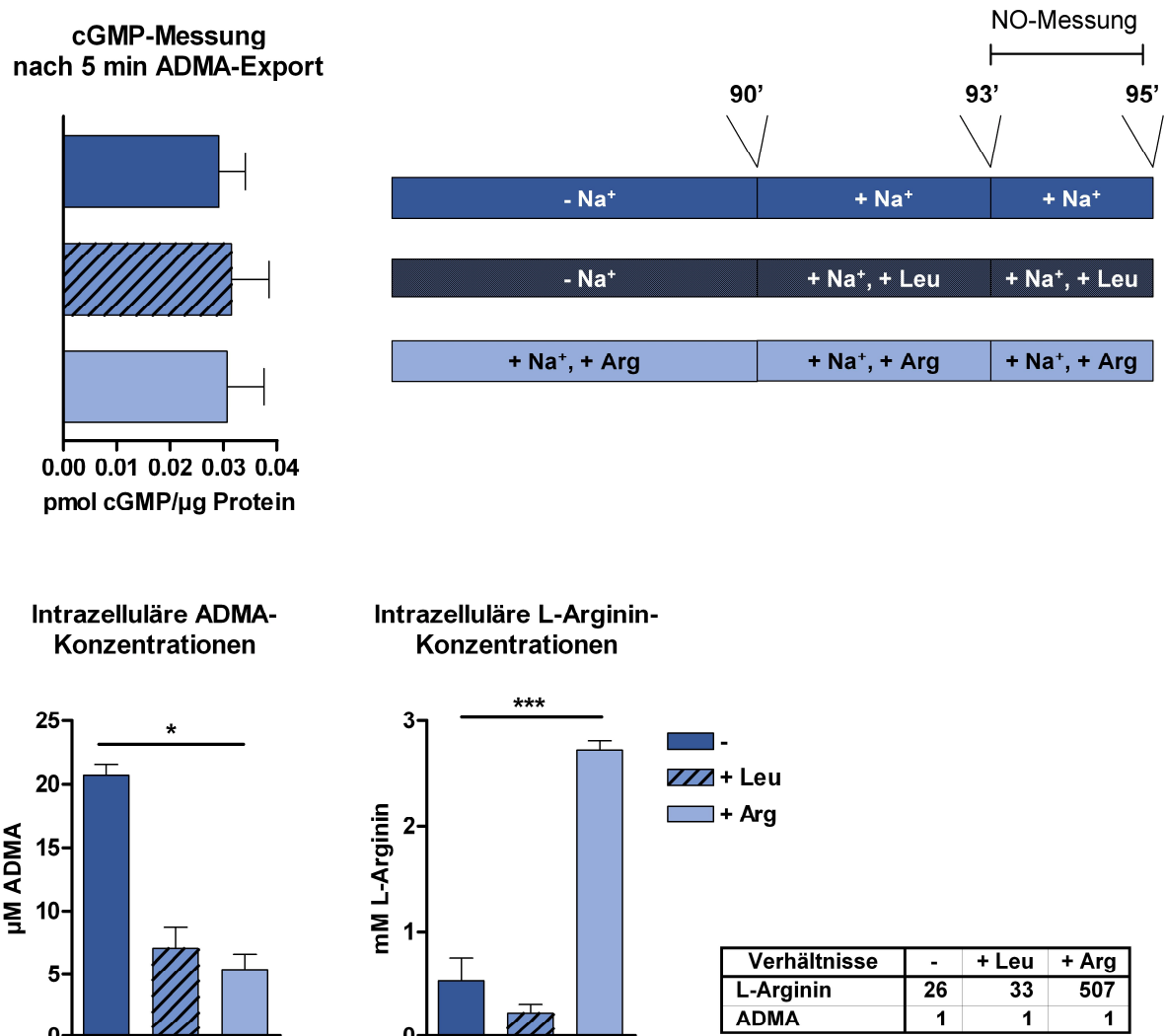


Abb. 30: cGMP-Produktion in EA.hy926-Zellen unter intrazellulär akkumuliertem ADMA und nach 5 min Export. Konfluente EA.hy926-Zellen in 24 Loch-Platten wurden 5x mit 500 µl eiskalter LL ohne Na⁺ gewaschen und entweder 90 min in LL mit 1 mM L-Arginin (hellblau) oder 90 min in LL ohne Na⁺ (blau und blau-schraffiert) inkubiert. In den ersten 60 min erfolgte ein Mediumwechsel nach 30 min, in den letzten 30 min erfolgten alle 10 min Medienwechsel. Drei min vor cGMP-Messung wurde einem Teil der zuvor in LL ohne Na⁺ inkubierten Zellen dieselbe Lösung mit 1 mM L-Leucin zugesetzt (blau-schraffiert). Die angegebenen Lösungen waren während der 2 min cGMP-Messung auf den Zellen. Abb. 30 zeigt oben links die cGMP-Messung und rechts das Behandlungsschema der Zellen, unten links die korrespondierenden intrazellulären ADMA-Konzentrationen und unten rechts die L-Argininkonzentrationen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM, n = 10 aus 3 Zellchargen. Die Tabelle zeigt die per HPLC analysierten, intrazellulären Verhältnisse von L-Arginin zu ADMA an.

Aus der Abbildung 30 (oben links) wird ersichtlich, dass es keinen Unterschied der cGMP-Produktion der unterschiedlich behandelten Gruppen gibt: der cGMP-Spiegel und damit die Produktion bioaktiven Stickstoffs ist sowohl bei den Zellen mit Transporterhemmung als auch bei den Zellen mit 5-minütiger Transporteraktivität vergleichbar mit der NO-Produktion der Positivkontrolle. Die via HPLC bestimmten

intrazellulären ADMA- und L-Argininkonzentrationen belegen weiter, dass bei den Transport-gehemmten Zellen tatsächlich eine intrazelluläre Konzentration von $20,688 \pm 0,899 \mu\text{M}$ ADMA im Vergleich zu $5,371 \pm 1,208 \mu\text{M}$ bei den Zellen der Positivkontrolle und $7,042 \pm 1,645 \mu\text{M}$ bei den Zellen mit 5-minütigem ADMA-Export herrschte. Dies bedeutete, dass die ADMA-Akkumulation mit der Strategie der Transporterhemmung über Entzug von Austauschsubstrat gelungen war. Betrachtet man nun allerdings die L-Argininkonzentrationen, so fällt auf, dass sich die bei Transporterhemmung intrazellulär gemessene L-Argininmenge von $0,535 \pm 0,22 \mu\text{M}$ bei 5 min erlaubtem Export ebenso wie das ADMA auf $0,235 \pm 0,082 \mu\text{M}$ verringert hatte. Dies wird nochmals bei Hinzuziehen des Arg/ADMA-Verhältnisses deutlich, das in der Tabelle angegeben ist: hier veränderte sich das Arg/ADMA-Verhältnis bei zugelassenem Transport nur auf 33:1 im Vergleich zu jenem von 26:1 bei Transporterhemmung. Dies scheint auf den ebenso verringerten L-Arginin- wie ADMA-Spiegel bei 5-minütigem Transport zurückzugehen.

Teil III: Humane periphere mononukleäre Blutzellen

3.7 ADMA-Exportmessung an humanen peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

In diesem Teil der Arbeit soll in einem translationellen Ansatz im Rahmen des „Center for Thrombosis and Hemostasis“ (CTH) und in Zusammenarbeit mit Medizinerinnen aus der 2. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz eine Studie zur Beantwortung der Frage begonnen werden, ob ein gestörter ADMA-Export mit endothelialer Dysfunktion korreliert. Da hierzu keine Endothelzellen von Patienten zu bekommen waren, wurden alternativ deren Blutzellen auf ihren ADMA- und L-Arginin-Export überprüft. Zudem wurde Gesamt-RNA aus den PBMCs isoliert und für eine quantitative real time-PCR verwendet werden, um eventuelle Abweichungen in der Expression der γ^+ - und γ^+L -Systems zu finden. Für eine später durchzuführende Analyse auf Proteinebene sollten zudem Proteinproben aus einem Teil der PBMCs für einen Western Blot hergestellt werden. Die Sensitivität der von der AG Closs in Auftrag gegebenen Antikörper war bis zum Ende des experimentellen Teils dieser Arbeit zur Detektion endogener Transporter nicht ausreichend.

3.7.1 Etablierung des Studienprotokolls

Zunächst sollte für die quantitative real time-PCR die Verwendung des am besten geeigneten Referenzgens überprüft werden. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Vollblutproben und isolierten PBMCs mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden) gewonnen und in einer qRT-PCR gegen unterschiedliche Referenzgene getestet. In den unten gezeigten Tabellen ist jeweils der Mittelwert des ct-Wertes der Isoformen von $\gamma^+LAT \pm SEM$ angegeben und darunter die Differenz zum Mittel des ct-Wertes des zu testenden Referenzgens. Getestet wurden die zuvor verwendete GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase), die Polymerase 2A (Pol2A) und das Beta-2-Mikroglobulin (B2M). Die GAPDH ist ein Enzym, das in der Glykolyse dabei hilft, Glucose zu Energie und Kohlenstoffbausteinen zu metabolisieren. Pol2A ist ein in eukaryotischen Zellen vorkommendes Enzym, das die Transkription von DNA

katalysiert, hingegen ist B2M ein MHC Klasse I-Molekül, das auf allen Zellen mit Zellkern vorkommt und bei der Entwicklung der erworbenen Immunität eine bedeutende Rolle spielt.

Vollblut	y ⁺ LAT1	y ⁺ LAT2
ct-Mittelwert	21,625 ± 0,225	25,525 ± 0,259
delta ct zu hGAPDH	2,050 ± 0,323	5,950 ± 0,348
delta ct zu hPol2A	-6,750 ± 0,514	-2,850 ± 0,530
delta ct zu hB2M	1,125 ± 0,453	5,025 ± 0,471

Tab. XIV: Expression von System y⁺L im Vollblut. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) aus Vollblutproben von vier freiwilligen Probanden aus dem Institut für Pharmakologie isoliert und eine qRT-PCR mit unterschiedlichen Referenzgenen durchgeführt.

PBMC	y ⁺ LAT1	y ⁺ LAT2
ct-Mittelwert	20,400 ± 0,356	24,250 ± 0,185
delta ct zu hGAPDH	1,950 ± 0,441	5,800 ± 0,319
delta ct zu hPol2A	-6,350 ± 0,633	-2,500 ± 0,555
delta ct zu hB2M	1,050 ± 0,524	4,900 ± 0,426

Tab. XV: Expression von System y⁺L in isolierten PBMC. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) aus frisch isolierten PBMCs von vier freiwilligen Probanden aus dem Institut für Pharmakologie isoliert und eine qRT-PCR mit unterschiedlichen Referenzgenen durchgeführt.

Barber und Kollegen stellten bereits fest, dass die GAPDH zwar das meist verwendete Referenzgen darstellt, aber auch, dass es in seiner Expressionsrate selbst schwanken kann (Barber, Harmer, Coleman, & Clark, 2005). Da jenes für die qRT-PCR verwendete Referenzgen möglichst wenigen Schwankungen unterliegen soll, wurde der SEM-Wert hinzugezogen. Dieser zeigte, dass die Expression dieses Gens in den hier verwendeten humanen Geweben am geringsten ist und die GAPDH als Referenzgen beibehalten werden konnte.

Zur Erstellung des am besten geeigneten Protokolls für die Patientenstudie wurden unterschiedliche Vorversuche mit Freiwilligen aus dem Pharmakologischen Institut, Buffy coats aus der Blutbank und auch bereits in der Klinik der Universitätsmedizin Mainz befindlichen Patienten durchgeführt, die im Folgenden kurz skizziert werden

sollen. Das Protokoll sollte Ergebnisse liefern, die den durch unterschiedliche Transportsysteme vermittelten L-Arginin- und ADMA-Export zeigen.

- Zeitverlauf einer [³H]-L-Arginininfluxmessung

Da die [³H]-L-Arginininfluxmessung ein fester Bestandteil des Methodenspektrums der Arbeitsgruppe Closs ist, wäre eine Messung dieser Transportaktivität eine zeit- und kostensparende Alternative zur direkten Messung des ADMA-Exports und der nachfolgenden Analyse in der HPLC gewesen. Hierzu erfolgten Versuche mit PBMCs, die aus buffy coats der Blutbank isoliert wurden. Diese buffy coats fallen als Nebenprodukt bei der Verarbeitung einer Vollblutspende an wenn diese zu Erythrozytenkonzentraten und Frischplasmaprodukten verarbeitet werden. Er besteht hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen und Thrombozyten.

Zur Messung des [³H]-L-Arginininfluxes wurden 700 µl Zellen, die in Locke's Lösung resuspendiert wurden, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben, das bereits mit einer doppelt konzentrierten Argininmischung (100 µM L-Arginin und 10 µCi [³H]-L-Arginin) befüllt war und im 37° C-Wasserbad inkubiert wurde. Die Endkonzentration betrug 50 µM L-Arginin und 5 µCi [³H]-L-Arginin. Nach 5, 15, 30, 45 und 60 sek Transport wurde der [³H]-L-Arginininflux beendet durch Transfer von je 200 µl Zellsuspension in Zentrifugationsröhrchen, die mit 10 ml eiskaltem 1 mM Harnstoff in LL befüllt waren und auf Eis standen. Der Inhalt wurde auf Filter mit 0,45 µm Porengröße ausgeschüttet und dieser 3x mit je 10 ml der Harnstoffwaschlösung gewaschen. Die Filter mit den gewaschenen Zellen wurden anschließend in Messröhrchen gegeben, die Zellen 20 min lang mit 2 % SDS lysiert und nach Zugabe von je 2 ml Szintillationsflüssigkeit (LumaSafe Plus, Perkin Elmer, Rodgau) im β-Zähler auf die transportierte Menge an Radioaktivität analysiert. Bei der ersten Durchführung verstopften die Filter, so dass die Waschung der Zellen ungründlich durchgeführt wurde, was in keinem Zeitverlauf mündete. Nach einer vorherigen 1:1-Verdünnung der Zellen konnte ordnungsgemäß gewaschen werden, allerdings war trotzdem kein Zeitverlauf erkennbar.

- ADMA-Akkumulation und nachfolgende Export-Messung

Weiterhin wurde versucht, das endogen gebildete ADMA 90 min lang intrazellulär durch Inkubation in Locke's Lösung ohne Natrium bei 37° C analog zu den bei EA.hy926-Zellen durchgeführten Versuchen (Kap. 3.3) zu akkumulieren. Dieser Ansatz scheiterte an der Aggregation der Zellen, die sich als schwer vereinzelt zu erhalten erwiesen. Ein dafür gebauter 360°-Schwenker, der sich im Inkubator deponieren und mit 180 Umdrehungen/min antreiben ließ, erfüllte seinen Zweck nicht, da die Zellen in 2 ml-Reaktionsgefäßen angebracht werden mussten und daher die Inkubationszeit hindurch an Hypoxie litten. Auch ein Versuch in einer 24 Loch-Platte brachte keine stimmigen Ergebnisse, möglicherweise abermals durch Zellaggregation, da die 24 Loch-Platte aufgrund ihres lose aufliegenden Deckels nur in einem Inkubator mit Schüttler untergebracht werden konnte. Weiterhin wurde bei diesem Vorversuch das Probenvolumen so eingestellt, dass sich in jeder Probe 1 Million Zellen befanden, was in einem zu geringen Volumen (130 µl) und damit in einer dramatischen Verringerung des Pellets bei den nachfolgenden Waschungen resultierte.

- Sofortexport an isolierten PBMC

Ein letzter Ansatz wurde an Buffy coats getestet, die aus der Blutbank der Universitätsmedizin Mainz stammten: hierbei wurde jeder Buffy coat mit der gleichen Menge an DPBS verdünnt und 25 ml davon über einen Polysucchrosegredienten von den Erythrozyten getrennt. Die PBMCs wurden abgenommen und 4 x mit eiskalter LL mit Natrium gewaschen. Die in LL resuspendierten PBMCs wurden so in 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt, dass entweder keine weitere Aminosäure, 0,5 mM L-Orn, 0,5 mM L-Lysin oder 0,5 mM L-Leucin zugesetzt war. Die Reaktionsgefäße wurden 5 min im 37° C-Wasserbad schwimmend inkubiert, wobei jede Minute einmal invertiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Dann wurde das Pellet 2x gewaschen, dazwischen abzentrifugiert und die Zellen lysiert, um die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen bestimmen zu können. Die Extrazellulärpuffer und die Lysate wurden dann per HPLC auf die enthaltenen ADMA- und L-Argininkonzentrationen analysiert. In Abbildung 31 ist in der oberen Reihe die ADMA-

Menge pro Millionen Zellen der beiden Buffy coats erkennbar. Die untere Reihe zeigt die entsprechenden L-Argininmengen. Der dunkle Abschnitt jeder Säule markiert den intrazellulären Gehalt, der aus dem Lysat der PBMCs bestimmt wurde, hell ist jeweils der exportierte Anteil, der sich im Extrazellulärpuffer befand.

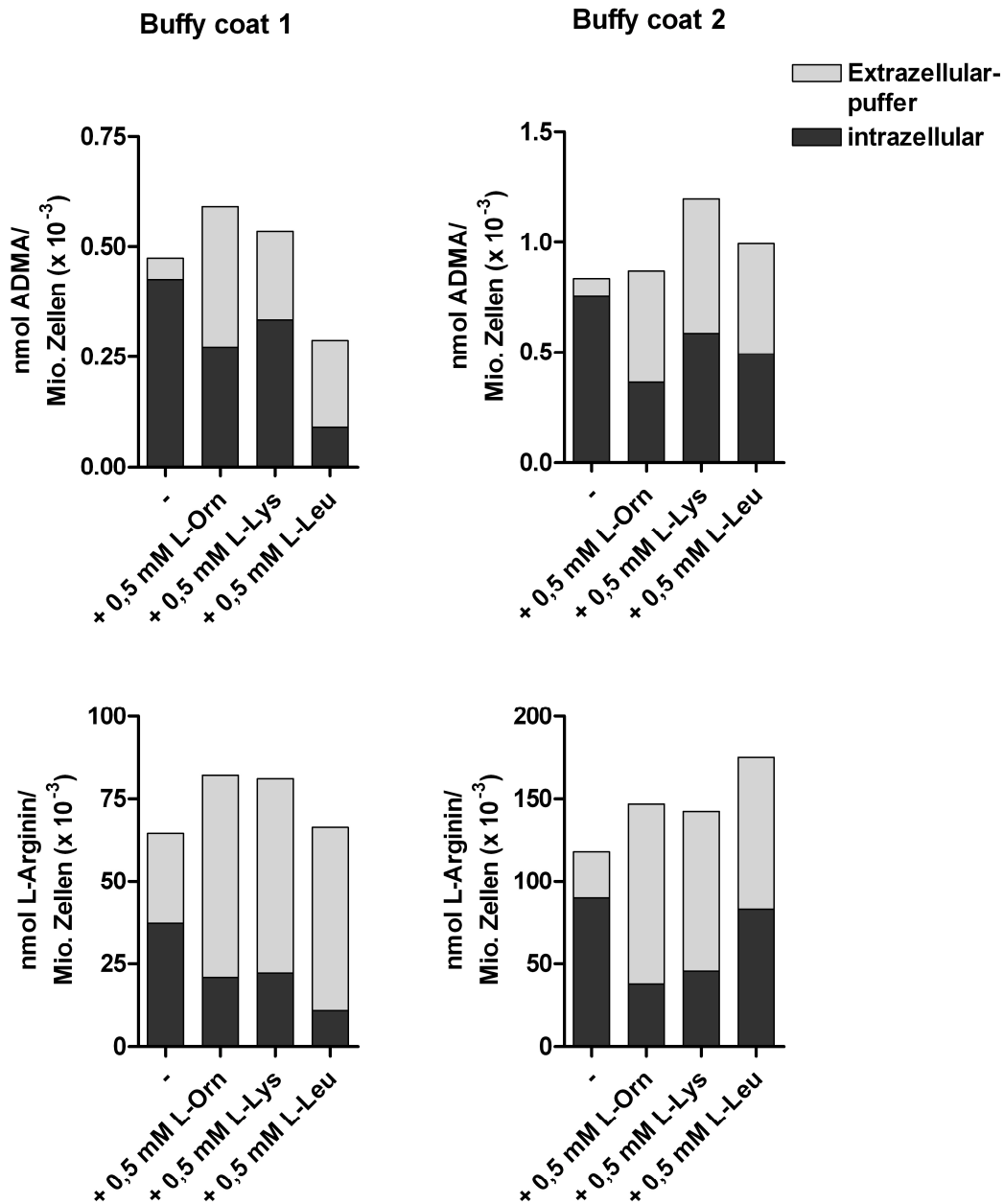


Abb. 31: Durch System y⁺ und System y⁺L vermittelter ADMA- und L-Argininexport an isolierten PBMC aus zwei unterschiedlichen Buffy coats. PBMCs wurden aus Buffy coats über einen Polysucrosegradienten isoliert und 4x mit eiskalter LL gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml LL aufgenommen und entweder ohne Aminosäuren, oder 200 µl davon mit je 0,5 M L-Arginin, L-Ornithin, L-Lysin oder L-Leucin 5 min im 37° C-Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jede Probe 5 min bei 400 g und 4° C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde 2x mit eiskalter LL gewaschen und dazwischen jeweils 5 min bei 400 g und 4° C zentrifugiert. Zuletzt wurden die PBMCs in je 200 µl 70 % Ethanol lysiert. Die Überstände und die Lysate wurden dann per HPLC auf die enthaltenen ADMA- und L-Argininkonzentrationen analysiert.

Man kann bereits an diesem ersten Versuch dieser Art sehen, dass sich die Gesamtmengen an ADMA und L-Arginin, also die obere Grenze aller Säulen, im gleichen Bereich befanden. Die Tatsache, dass sich nicht völlig ähneln, mochte an der bis dahin nicht vorhandenen Routine und Zügigkeit liegen.

- Validierung der Messwerte

Nachdem das Protokoll zur Isolation der PBMCs und für den Exportversuch etabliert werden konnte, lag eine weitere Hürde in der Wiederholbarkeit der Messwerte. Besonders die Menge des aus den PBMCs exportierten ADMA befand sich am unteren Ende der Kapazität der HPLC-Anlage. Daher wurden drei Patienten die doppelte Menge Blut (60 ml) abgenommen, um die Isolation und den Exportversuch in Doppelbestimmung zu validieren.

Abbildung 32 zeigt die Auswertung der Doppelbestimmung des Extrazellulärpuffers: die L-Arginin- und ADMA-Mengen befinden sich jeweils im rechten und linken Graphen. Der erste Punkt der Kurve stellt jeweils den unspezifischen Export dar, da dieser ohne Austauschsubstrat erfolgte. Der zweite Punkt stellt den Gesamtexport dar, der mit 1 mM L-Lysin im Extrazellulärpuffer durchgeführt wurde, das als basische Aminosäure sowohl ein Austauschsubstrat für die CATs als auch die γ^+ LATs darstellt. Der letzte Punkt zeigt die L-Arginin- bzw. ADMA-Menge an, die nur über das System γ^+ L exportiert wurde, da sich hier 1 mM der neutralen Aminosäure L-Leucin im Extrazellulärpuffer befand, die nicht als Substrat für γ^+ in Frage kommt.

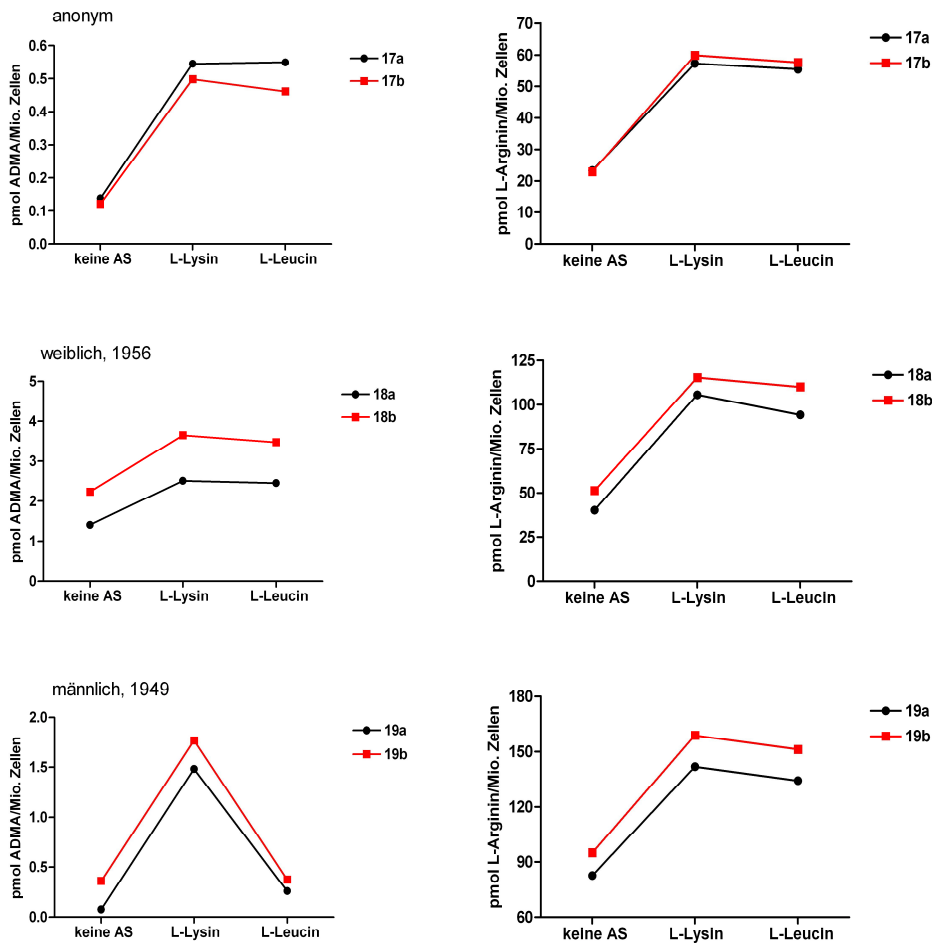


Abb. 32: ADMA- und L-Argininexport aus isolierten PBMCs in Doppelbestimmung.

Frisch isolierte PBMCs der Studienteilnehmer wurden in doppeltem Ansatz 5 min bei 37°C im Wasserbad in LL, in LL mit 1 mM L-Lysin oder in LL mit 1 mM L-Leucin inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C und 600 g abzentrifugiert und der Überstand in der HPLC auf die exportierte Menge ADMA und L-Arginin analysiert. Die Graphik zeigt in jeder Reihe einen anderen Studienteilnehmer, links jeweils die ADMA- und rechts die L-Argininwerte.

Die Frage der Wiederholbarkeit ist hier positiv zu beantworten, denn die Messwerte beider Bestimmungen lagen eng beieinander, sodass eine eventuell vorkommende Auffälligkeit keinen Messfehler darstellen sollte. Solch eine Auffälligkeit wurde hier bereits deutlich bei Patient 19 (männlich, Geburtsjahr 1949): in den Exportdaten der anderen beiden Personen schien der Export von ADMA und L-Arginin hauptsächlich über y^+LAT zu erfolgen, was erkennbar ist an den ähnlichen Exportmengen im Gesamtexport (mit L-Lysin) und im y^+LAT -vermittelten Export (mit L-Leucin). Bei Patient 19 hingegen war beinahe kein ADMA-Export via y^+LAT (mit L-Leucin) erkennbar, wohingegen der Export von L-Arginin keine Auffälligkeit zeigte und ebenso wie bei den anderen beiden Personen hauptsächlich über y^+LAT zu erfolgen schien. Dies sind die auffälligen Extreme, die in dieser Studie gesucht wurden.

3.7.2 Erste Ergebnisse der Studie

Bei der Auswertung der ersten Daten der Studie wurde eine Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Ein- und Ausschlusskriterien für die Studie festgestellt: es wurde prospektiv bestimmt, dass Patienten mit Stenosen, also einer Verengung von Koronarblutgefäßen, eine pathologische Veränderung des ADMA-Exports aufweisen müssten, da sie sonst keine Stenose hätten. Der Fehlschluss dieses Ansatzes ist aber, dass nicht jeder Patient mit einer Stenose auch eine Pathologie im ADMA-Metabolismus aufweist. Eine Stenose kann auch andere Ursachen als erhöhte ADMA-Werte haben. Weiterhin wäre in diesem Fall der einleitend erwähnte Patient von 2004 im Universitätsklinikum Mainz unter diesen Prämissen in die Kontrollpatientengruppe eingeteilt worden. Er hatte eine schwere Endotheldysfunktion und scheinbar keinerlei γ^+ LAT-vermittelten ADMA-Export, aber keine Stenose.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurden alle Daten doppelt ausgewertet: erstens im Hinblick auf die vorher festgelegten Kriterien und zweitens – soweit vorhanden – aufgrund von Werten aus der Messung der Fluss-vermittelten Dilatation der Patienten (flow-mediated dilation, FMD). Es handelt sich hierbei um eine allgemein anerkannte, nicht-invasive Methode zur Bestimmung der Endothelfunktion.

3.7.2.1 Expression der Endothel-spezifischen Transporter

In den Abbildungen 33 und 34 wird die relative Expression der in PBMCs vorhandenen basischen Aminosäuretransporter eingeteilt in die drei Studiengruppen dargestellt. Hell erscheinen jeweils die Expressionen der Außengruppe, grau sind diejenigen der Kontrollpatienten und dunkel sind die Transporterexpressionen der Patienten gefärbt. In Abbildung 33 ist die Einteilung der Gruppen nach den vorher festgelegten Kriterien und in Abbildung 34 die Einteilung nach Endothelfunktion zu sehen. Bei letzterer wurden Patienten mit einer Fluss-vermittelten Dilatation von weniger oder gleich 3 % als diejenigen mit schlechter Endothelfunktion bezeichnet. Es handelt sich dabei um einen willkürlichen Wert, der auf Anraten von Univ.-Prof. Dr. med. Münzel (Direktor der 2. Medizinischen Klinik, Universitätsmedizin Mainz) für diese Studie festgelegt wurde.

Aufgrund der vorhandenen SEM-Werte und kleiner Patientenzahl war keine Signifikanz der Expressionsdaten erkennbar. Alle Expressionen wurden gegen die der Außengruppe auf Signifikanz geprüft.

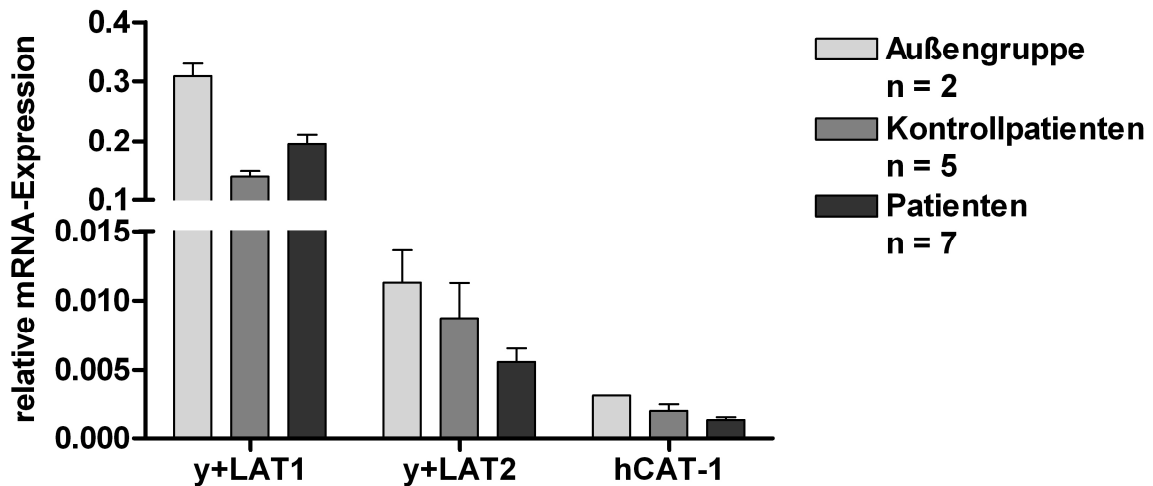


Abb. 33: Relative Expression der Membrantransporter y⁺LAT1, y⁺LAT2 und hCAT-1 in den Studiengruppen. Aus frisch isolierten PBMC der Studienteilnehmer wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) die Gesamt-RNA isoliert und die relative Menge der Membrantransporter y⁺LAT1, y⁺LAT2 und hCAT-1 in einer quantitativen real time-PCR gegen GAPDH als Referenzgen analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

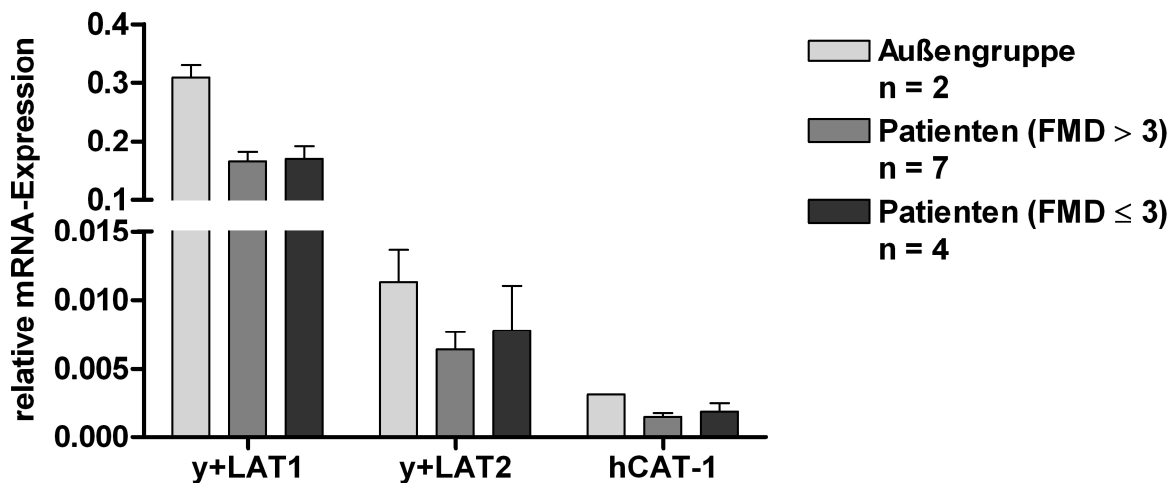


Abb. 34: Relative Expression der Membrantransporter y⁺LAT1, y⁺LAT2 und hCAT-1 in den Studiengruppen eingeteilt nach Endothelfunktion. Aus frisch isolierten PBMC der Studienteilnehmer wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) die Gesamt-RNA isoliert und die relative Menge der Membrantransporter y⁺LAT1, y⁺LAT2 und hCAT-1 in einer quantitativen real time-PCR gegen GAPDH als Referenzgen analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM.

3.7.2.2 ADMA- und L-Argininexport aus PBMCs

In den Abbildungen 35 bis 37 sind die durch die PBMCs exportierten ADMA- und L-Argininmengen der einzelnen Probanden eingeteilt in die Studiengruppen zu sehen. Über jeder Graphik finden sich weitere Information zur Testperson, die zunächst eine allgemeine Laufnummer enthalten, dann folgt – falls vorhanden – der Wert der Flussvermittelten Dilatation, das Geschlecht und Geburtsjahr. Abb. 35 zeigt die Werte der Außengruppe mit den ADMA-Mengen als Kästchen und den L-Argininmengen als Dreieck. Ebenso zeigt die Abb. 36 die Gruppe der Kontrollpatienten, die aufgrund der vorher definierten Kriterien keine Stenose haben und in Abb. 37 sind die Patienten mit Stenosen zusammengefasst.

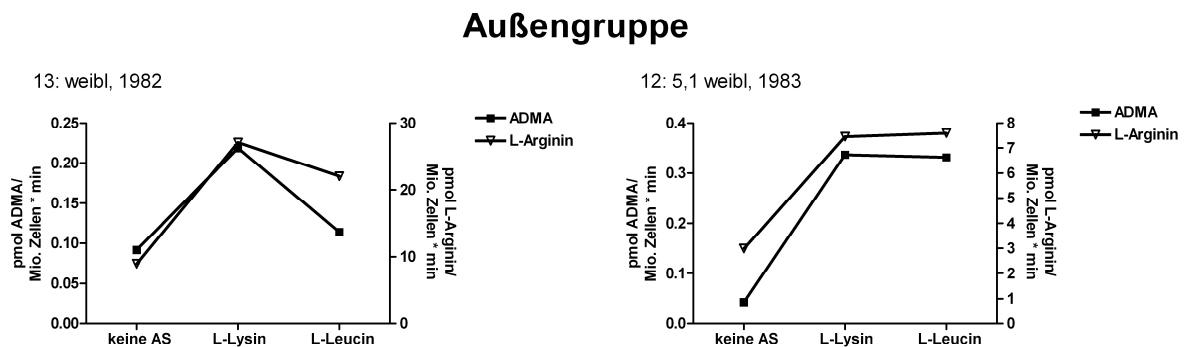
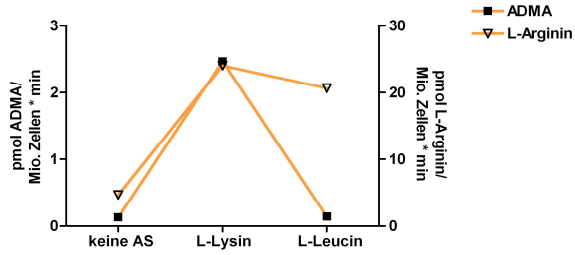


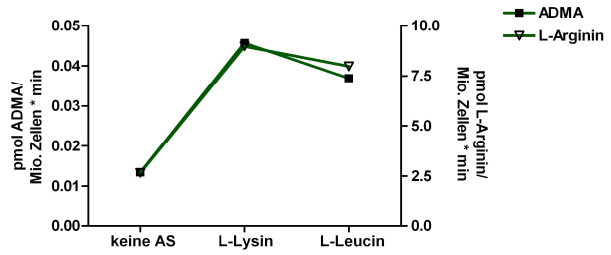
Abb. 35: ADMA- und L-Argininexport aus isolierten PBMCs der Außengruppe. Frisch isolierte PBMCs der Außengruppe wurden 5 min bei 37°C im Wasserbad in LL, in LL mit 1 mM L-Lysin oder in LL mit 1 mM L-Leucin inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C und 600 g abzentrifugiert und der Überstand in der HPLC auf die exportierte Menge ADMA und L-Arginin analysiert. Angegeben ist der ADMA- (schwarze Kästchen) und der L-Argininexport (offene Dreiecke).

Kontrollpatienten

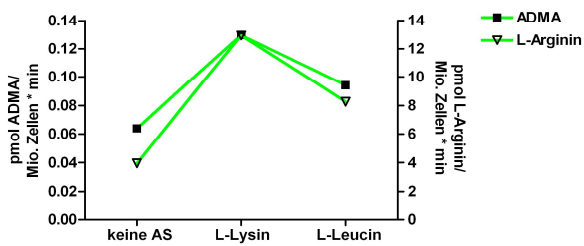
3: K 4,6 weibl 1950



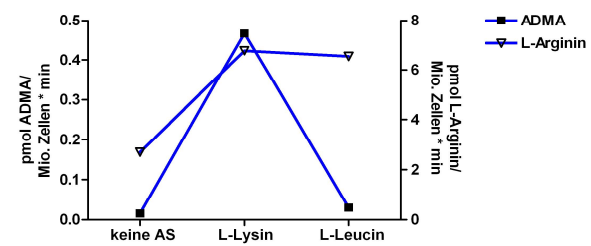
5: K 4,1 weibl 1957



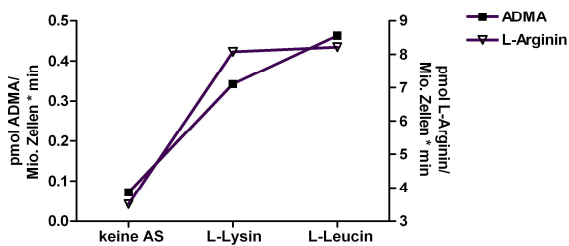
6: K 4,8 weibl 1944



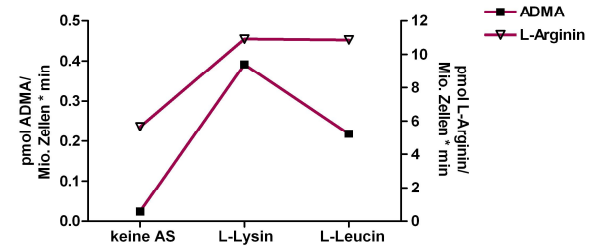
7: K 2,3 weibl 1959



9: K 8,2 weibl 1936



14: K 0,4 männl 1956



16: K 8,7 weibl 1936

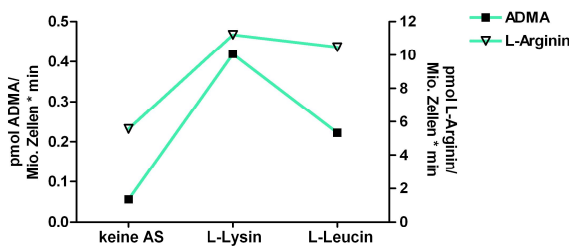


Abb. 36: ADMA- und L-Argininexport aus isolierten PBMCs der Kontrollpatienten. Die isolierten PBMCs der Kontrollpatienten wurden wie in Abb. 35 beschrieben auf ihren ADMA- und L-Argininexport untersucht.

Patienten

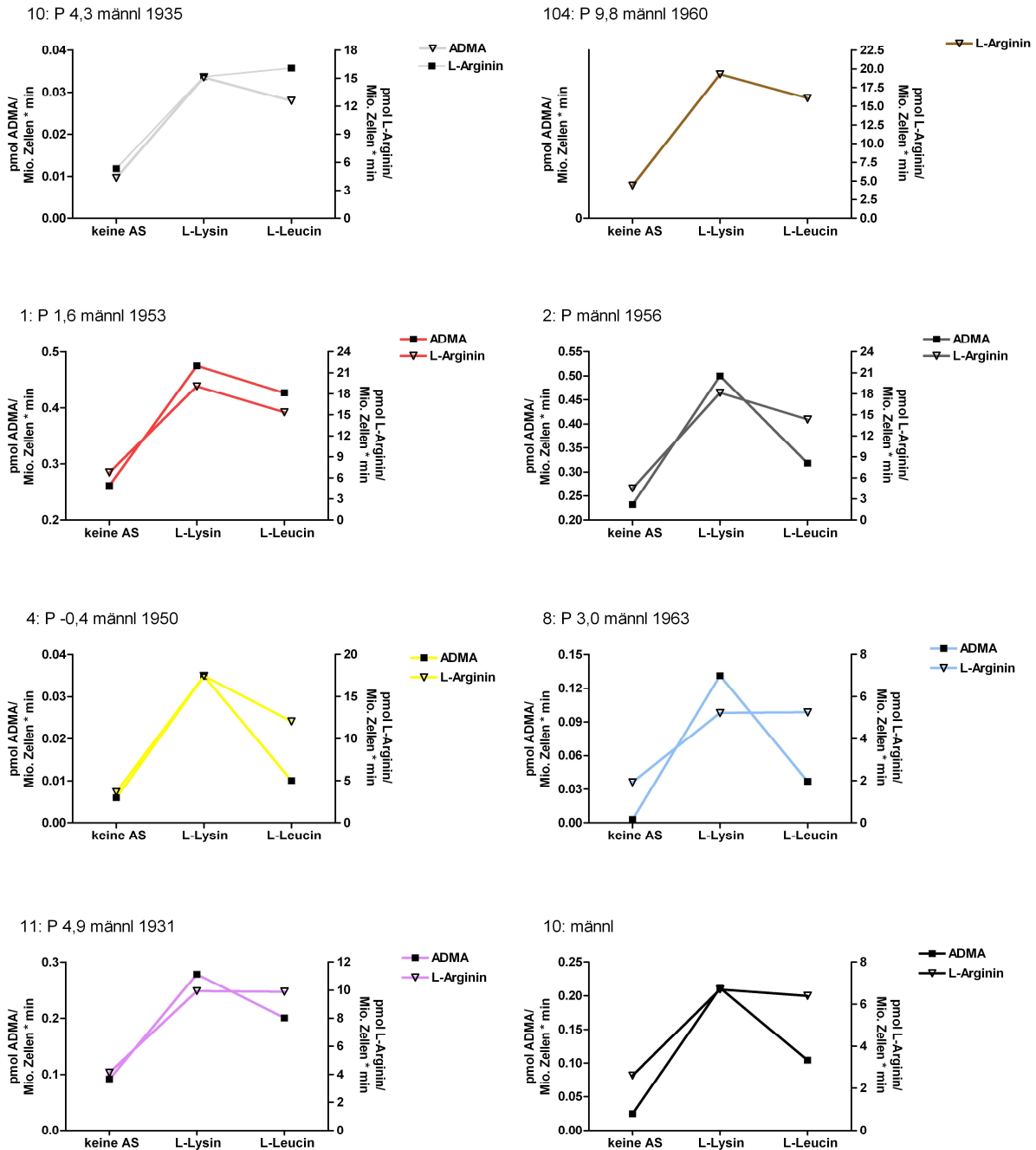


Abb. 37: ADMA- und L-Argininexport aus isolierten PBMCs der Patienten. Isolierte PBMCs der Patienten wurden wie in Abb. 35 beschrieben auf ihren ADMA- und L-Argininexport untersucht.

Bei Betrachtung der Exportdaten jeder einzelnen Person und unter Berücksichtigung der Eingruppierung konnte festgestellt werden, dass in jeder Gruppe Personen mit unterschiedlichem ADMA-Exportvermögen zu finden waren: Es waren Personen, deren ADMA-Export via γ^+ LAT (mit L-Leucin) den größten Anteil am Gesamtexport

(mit L-Lysin) bildete, weiterhin Personen, deren y^+ LAT-vermittelter ADMA-Export ungefähr die Hälfte des Gesamtexports ausmachte und auch solche, die augenscheinlich keinen y^+ LAT-vermittelten ADMA-Export aufwiesen. Dies konnte anhand der Steigung zwischen dem Gesamttransport und dem y^+ LAT-vermittelten Transport bestimmt werden: wenn die Exportmenge via y^+ LAT (mit L-Leucin) genauso groß war wie der Gesamtexport via CAT und y^+ LAT (mit L-Lysin), dann machte das System y^+ L den größten Anteil des Gesamtexports aus. Bei einer größer werdenden Steigung sank der y^+ LAT-vermittelte Anteil um den angegebenen Wert und das System y^+ war in zunehmendem Maße für den übrigen Export verantwortlich.

Abbildung 38 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Gruppen. Die oberen beiden Graphen zeigen den mittleren ADMA- und L-Argininexport der Kontrollpatienten und Patienten wenn diese nach den vor Beginn der Studie festgelegten Kriterien eingeteilt wurden. Hierbei stellte der erste Punkt der Kurve abermals den unspezifischen Export dar, der ohne Austauschsubstrat erfolgte. Aus dem mittleren Punkt konnte der Gesamtexport abgelesen werden. Der letzte Punkt zeigte die exportierte L-Arginin- oder ADMA-Menge an, die nur über das System y^+ L exportiert wurde. Man kann hierbei sehen, dass im Mittel die Hälfte des ADMA-Gesamtexports in beiden Gruppen vom System y^+ L vermittelt wird, da der ADMA-Export gegen L-Leucin auf ungefähr die Hälfte des Gesamtexports abfällt. Auch bei einer Einteilung der Patienten in jene mit guter und jene mit schlechter Endothelfunktion (Abb. 38, untere Graphen) war kein Unterschied des ADMA- oder L-Argininexportvermögens bei den Patienten zu erkennen.

~ Ergebnisse ~

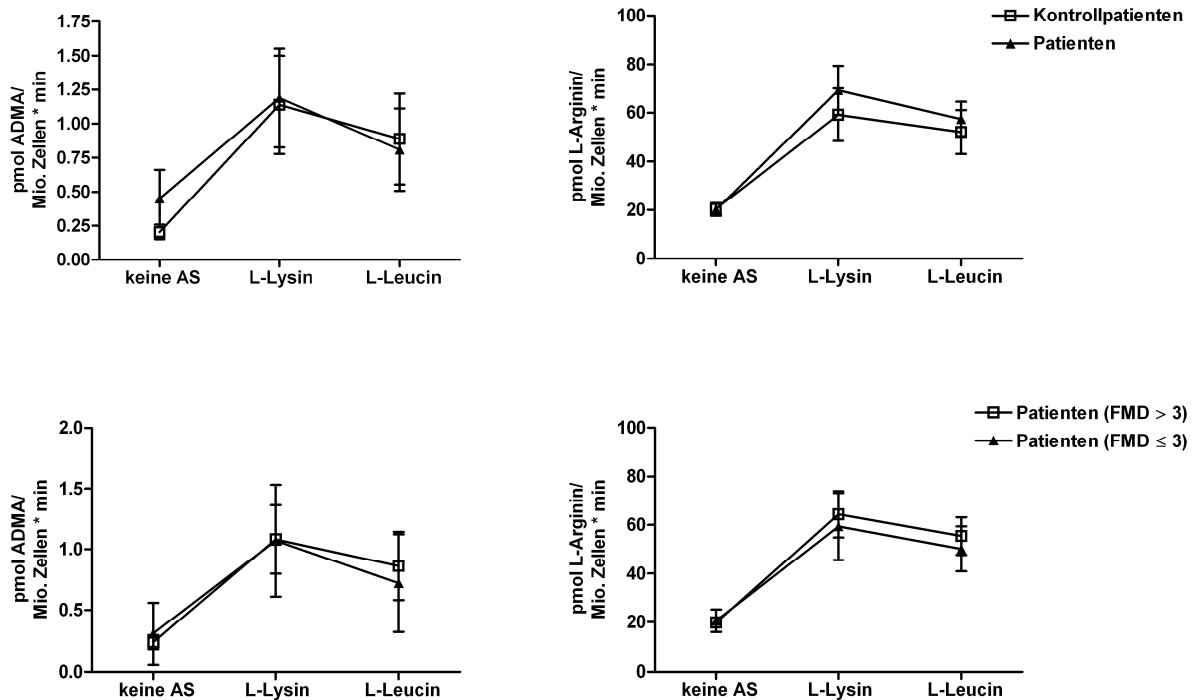


Abb. 38: ADMA- und L-Argininexport aus isolierten PBMCs der Studienteilnehmer.

Isolierte PBMCs der Studienteilnehmer wurden wie in Abb. 35 beschrieben auf ihren ADMA- und L-Argininexport untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der Studienteilnehmer eingeteilt nach den vorher festgesetzten Kriterien in den oberen Abbildungen, in den unteren Abbildungen wurden die Patienten nach Endothelfunktion (über FMD bestimmt) eingeteilt. Die linken Graphen zeigen den ADMA-Export, die rechten zeigen den L-Argininexport.

Dies lässt sich wie in Abbildung 39 dargestellt auch als Verhältnis in einem Balkendiagramm zeigen. Hier wurde jeweils der Gesamtexport, der mit L-Lysin im Extrazellulärpuffer als Austauschsubstrat für CATs und γ^+ LATs gemessen wurde, bei jedem Patienten gleich 100 Prozent gesetzt und der Basal- und der γ^+ LAT-vermittelte Export hierzu für jeden Patienten einzeln ins Verhältnis gesetzt und gemittelt. Die oberen beiden Graphen zeigen die Verhältnisse der beiden Gruppen gemäß den Studienkriterien. In den beiden unteren Graphen der Abbildung 39 sind die Gruppen abermals nach guter und schlechter Endothelfunktion eingeteilt. Die Patienten mit schlechter Endothelfunktion zeigten einen tendentiell schlechteren ADMA-Export, allerdings war dieser statistisch nicht signifikant (Abb. 39, unten links).

~ Ergebnisse ~

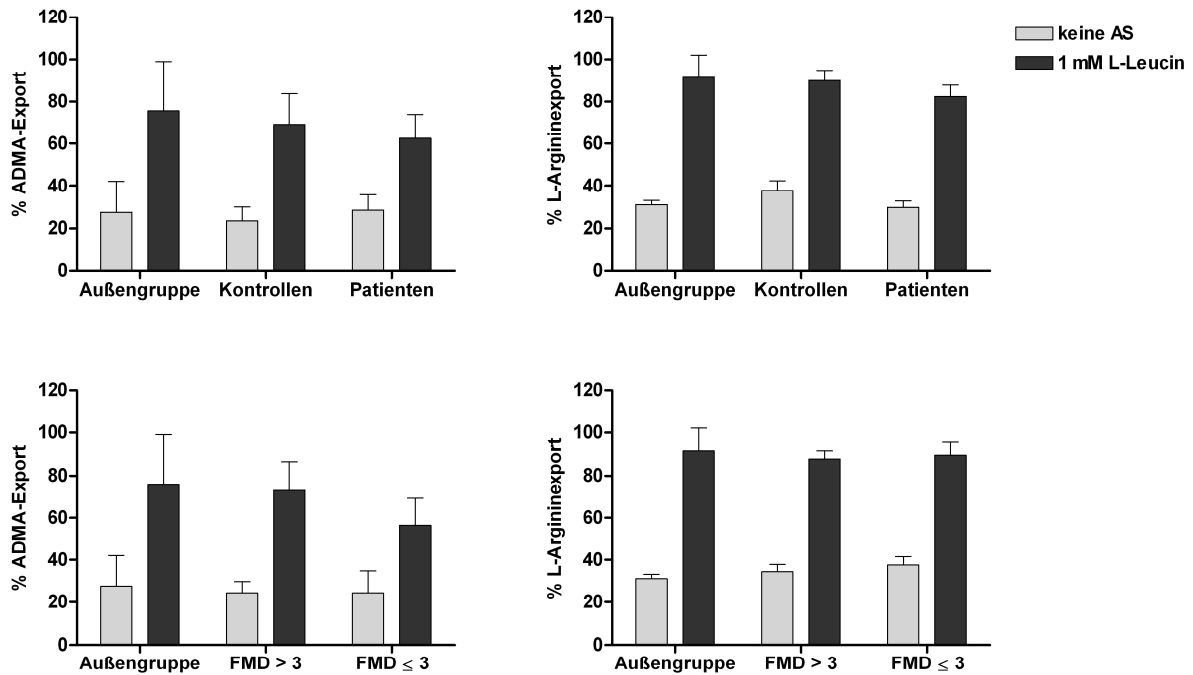


Abb. 39: Prozentualer ADMA- und L-Argininexport aus isolierten PBMCs. Frisch isolierte PBMCs der Studienteilnehmer wurden wie in Abb. 35 beschrieben auf ihren ADMA- und L-Argininexport untersucht. Der Totalexport gegen L-Lysin wurde gleich 100% gesetzt; angegeben ist in hellgrau der ADMA- (linke Seite) und der L-Arginin-Export (rechte Seite) gegen LL und in dunkelgrau der entsprechende Export gegen L-Leucin (γ^+ LAT-vermittelt). Die oberen Abbildungen zeigen die Einteilung der Patienten nach den vorher festgesetzten Kriterien, in den unteren Abbildungen wurden die Patienten nach Endothelfunktion (über FMD bestimmt) eingeteilt.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die intrazelluläre ADMA-Elimination unter dem Aspekt des Membrantransporter-vermittelten Exports aus der Endothelzelle heraus. Hierfür wurde im ersten Teil der physiologisch wichtige Membrantransporter für endogen gebildetes ADMA bestimmt und die Konsequenzen seines Funktionsverlusts ermittelt. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Export von ADMA- und L-Arginin aus humanen Blutzellen und untersucht eine mögliche Korrelation zwischen endothelialer Dysfunktion und gestörtem ADMA-Export.

4.1 Expressionsanalysen zeigen drei mögliche ADMA-Exportproteine und beide Isoformen des ADMA-metabolisierenden Enzyms DDAH in Endothelzellen

Das bisher lückenhafte Wissen bezüglich der Präsenz basischer Membrantransportproteine und der ADMA-metabolisierenden Enzyme (DDAH) in Endothelzellen wurde durch die Kultivierung und mRNA-Analyse verschiedener Endothelzelllinien vervollständigt. Dabei wurde zum einen auf die immortalisierte Linie EA.hy926 zurückgegriffen und weiterhin auch primäre Endothelzellen heran gezogen. Aus frischen Nabelschnüren wurden humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) isoliert und humane Koronararterien- und mikrovaskuläre Endothelzellen (HCAEC, beziehungsweise HCMEC) käuflich erworben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in einer quantitativen RT-PCR auf die Expression der Isoformen basischer Aminosäuretransporter (CATs und γ^+ LATs) und der Isoformen des ADMA-metabolisierenden Enzyms DDAH untersucht (Abb. 5, 6). Hierbei konnte ein erster Eindruck einer hohen physiologischen Relevanz der Isoform γ^+ LAT1 gewonnen werden, da dieser Membrantransporter in allen primären Endothelzellen relativ hoch exprimiert wurde, noch um ein Vielfaches höher als in der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926. Zudem konnten in allen Endothelzellen relativ ähnliche Expressionen der Isoform γ^+ LAT2 und des hCAT-1 gefunden werden. Dye und Kollegen hatten bereits festgestellt, dass in humanen Plazenta-

Endothelzellen die Isoformen CAT-1, CAT-2A und -2B und CAT-4, sowie beide γ^+ LATs exprimiert werden und zuvor konnte von Sala et al. das System γ^+ L in HUVECs bestätigt werden (Dye et al., 2004; Sala et al., 2001). Rotmann und Kollegen hatten weiterhin gezeigt, dass hCAT-1 in EA.hy926 und HUVECs vorkommt, während die anderen Isoformen der CAT-Familie nicht in diesen Endothelzellen gefunden wurden (Rotmann et al., 2007). Dies zeigt die Heterogenität der Expression basischer Aminosäuretransporter in unterschiedlichen Endothelzellen. Die Membrantransporter $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$ wurden in den untersuchten Endothelzellen nicht exprimiert.

Auch die Expressionen der ADMA-metabolisierenden Enzyme DDAH1 und -2 unterschieden sich in den einzelnen Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft. Hierbei dominierte DDAH1 im Vergleich mit der Expression ihrer Isoform in allen Endothelzellen, was nicht mit der Dot Blot-Analyse von Tran und Kollegen übereinstimmt. Sie analysierten das Vorkommen beider DDAH-Isoformen in 43 humanen Organproben und fanden eine hohe Dominanz der DDAH2 in Herz und Aorta (Tran et al., 2000). Dieser Unterschied mag an der von Tran et al. durchgeführten Expressionsanalyse der Gesamt-RNA eines kompletten Organs im Vergleich mit derjenigen einer Zelllinie liegen. Die gefundenen DDAH-Expressionsdaten weisen auf einen nicht unerheblichen Anteil der DDAH-Aktivität für die intrazelluläre ADMA-Elimination hin.

4.2 Exportstudien an *Xenopus laevis*-Oozyten zeigen mehrere mögliche ADMA-Exportproteine für Endothelzellen

Da bisher noch keine Informationen darüber vorlagen, ob die in den Endothelzellen gefundenen basischen Aminosäuretransporter ADMA als Substrat erkennen, wurden diese einzeln in *Xenopus laevis*-Oozyten überexprimiert und ihre ADMA-Exportvermittelnde Eigenschaft getestet. Dabei stellte sich heraus, dass alle basischen Aminosäuretransporter gemäß ihren in der Literatur angegebenen Eigenschaften ADMA aus der Oozyte exportieren konnten:

- Wenn exprimiert, exportierten beide Isoformen des Systems y^+L (y^+LAT1 und -2, jeweils koexprimiert mit 4F2hc) ADMA im Vergleich zu nicht exprimierenden Oozyten in höchst signifikantem Ausmaß (Abb. 1). Dies geschah im Austausch sowohl mit der neutralen Aminosäure L-Leucin als auch mit der basischen Aminosäure L-Ornithin (Devés, Chavez, and Boyd 1992). Beide Transporter waren bei Vorhandensein eines der beiden Austauschsubstrate auch in der Lage, symmetrisches Dimethyl-L-Arginin (SDMA) zu exportieren (Abb. 3).
- Der humane CAT-1 zeigte eine ebenso höchst signifikante ADMA-Exportaktivität im Austausch mit der basischen Aminosäure L-Ornithin, nicht aber gegen Leucin (Abb. 1). Auch konnte hCAT-1 symmetrisches Dimethylarginin gegen das basische L-Ornithin exportieren (Abb. 3).
- Weiterhin wurden erste Versuche zum ADMA-Exportvermögen des System $b^{0,+}$ Aminosäuretransporters ($b^{0,+}AT$, koexprimiert mit rBAT) unternommen (Abb. 2). Es zeigte sich dabei, dass $b^{0,+}AT$ ADMA in Anwesenheit von L-Ornithin effektiver zu exportieren schien als es bei L-Leucin im Extrazellulärpuffer der Fall war. Laut Literatur akzeptiert er sowohl basische als auch neutrale Aminosäuren als Substrate (Palacín et al., 1998).
- Das Ergebnis zum ADMA-Exportvermögen des Systems $ATB^{0,+}$ erstaunte insofern, als es ADMA sowohl gegen die basische Aminosäure L-Ornithin als auch gegen das neutrale L-Leucin exportierte (Van Winkle, Christensen, and

Campione, 1985; V. Ganapathy, Ganapathy, and Leibach, 2000) (Daten nicht gezeigt). Physiologisch handelt es sich bei dem Transporter um einen Vermittler der Reabsorption von Aminosäuren in der Niere und im Dünndarm. Da es sich hierbei um einen konzentrativen, an Natrium- und Chloridionen gekoppelten Transport handelt, war kein ADMA-Export zu erwarten. Eine Erklärung könnte ein fehlinterpretiertes ADMA-Exportvermögen von $ATB^{0,+}$ sein, das durch nicht vollständig dichte Oozyten und/oder einer adaptiven Regulation bedingt gewesen sein könnte. Taylor und Kollegen stellten bei depletierten *X. laevis*-Oozyten eine Adaptation der Genregulation bei endogenen Membrantransportern fest (Taylor et al., 1996): der natriumanhängige Transport erfährt eine Hoch-, der natriumunabhängige Transport hingegen eine Herunterregulation nach der Depletion. Weiterhin kommt beispielsweise ein System $y^+/b^{0,+}$ -vermittelter Transport endogen in *X. laevis*-Oozyten vor (Campa and Kilberg, 1989). Wenn dieser durch die lange Depletionszeit der Oozyten heraufreguliert wurde, könnte das injizierte ADMA in das Extrazellulärmedium gelangt und bei Abwesenheit von Austauschsubstraten durch den überexprimierten Transporter $ATB^{0,+}$ wieder effektiv importiert worden sein. Dies wäre dann in dem hier gefundenen, geringen ADMA-Export resultiert. Bei Anwesenheit der Austauschsubstrate hingegen, hätte $ATB^{0,+}$ diese zu einem höheren Anteil importiert und gleichzeitig mehr ADMA im Extrazellulärmedium belassen. Dies hätte zu dem falschen Rückschluss geführt, dass ADMA über $ATB^{0,+}$ heraus transportiert worden sei.

Die Verifizierung der letzten Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da weder $b^{0,+}$ noch $B^{0,+}$ in Endothelzellen exprimiert wurden. Dies sollte dennoch weiter analysiert werden, um eine mögliche Beteiligung dieser Transporter an der Effektivität der ADMA-Elimination aus dem Körper heraus abschätzen zu können. Auch eine Untersuchung ihres Exportvermögens von SDMA wäre interessant und weitere Analysen sollten folgen.

Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit sollte weiterhin bestimmt werden, ob L-Arginin und ADMA als Substrat von den Aminosäuretransportern ähnlich behandelt werden. Bei Injektion von L-Arginin und ADMA im Verhältnis von 10:1 behandelte nur

γ^+ LAT1 die beiden Aminosäuren beim Export gleich. Hier fanden sich L-Arginin und ADMA in einem Verhältnis von 8:1 bzw. 9:1, in Anwesenheit von L-Ornithin bzw. L-Leucin im Extrazellulärmedium.

Die Isoform γ^+ LAT2 hingegen exportierte gegen L-Ornithin mehr als 6 x so viel L-Arginin wie ADMA: die beiden Aminosäuren fanden sich im Extrazellulärpuffer in einem Verhältnis von 63:1 wieder. Gegen L-Leucin im Außenmedium fanden sich L-Arginin und ADMA in einem Verhältnis von 22:1 wieder, hier wurde doppelt so viel L-Arginin als ADMA exportiert. Die Literatur liefert keine Hinweise auf einen Einfluss des Austauschsubstrates auf die Substratwahl des Transporters, daher sollten die angegebenen Verhältnisse durch wiederholte Versuche validiert werden.

Der humane CAT-1 bevorzugte L-Arginin beim Export ebenso wie γ^+ LAT2, da sich mit der basischen Aminosäure L-Ornithin als Austauschsubstrat ein Verhältnis von 25:1 im Extrazellulärraum im Vergleich zum injizierten Verhältnis von 10:1 befand. In Anwesenheit des basischen L-Leucins im Extrazellulärraum fand im Vergleich mit Puffer-injizierten Oozyten analog zu der beschriebenen Substraterkennung der CATs kein Transport statt.

Diese Ergebnisse verstärkten den Eindruck, dass das System γ^+ L den physiologisch wichtigen ADMA-Exporter in Endothelzellen darstellt. Zum einen sind nur der humane CAT-1 und γ^+ LAT1 und -2 in diesen exprimiert, zum anderen könnte der humane CAT-1 das endogen anfallende ADMA nur gegen basische Aminosäuren im Plasma austauschen und somit aus der Zelle entfernen. Diese freien basischen Aminosäuren finden sich nur zu ungefähr 11 - 14 % in humanem Plasma, was in unterschiedlichen Studien an Erwachsenen geprüft wurde (Armstrong and Stave, 1973). Weiterhin stellt das System γ^+ LAT eine aktive Exportpumpe dar, die aufgrund ihrer Abhängigkeit vom in die Zelle hinein gerichteten Natriumgradienten ADMA im Austausch mit neutralen Aminosäuren effektiv aus den Zellen exportieren könnte. Dieser Umstand stellt unter physiologischen Bedingungen einen wichtigen Punkt dar, da intrazellulär anfallendes ADMA, das zudem eine in relativ geringen Konzentrationen vorkommende Aminosäure ist, gegen ihren Konzentrationsgradienten aus der Zelle heraus transportiert werden muss.

Die Versuche zur Substratbehandlung ließen einen bevorzugten L-Argininexport durch die Isoform γ^+ LAT2 erkennen, da das injizierte Verhältnis von 10:1 (L-Arginin:ADMA) sich nicht außerhalb der Oozyten wieder spiegelte. Es war bei

y^+ LAT2-überexprimierten Oozyten ein Vielfaches mehr L-Arginin im Extrazellulärraum vorhanden. Dies ließ den Rückschluss zu, dass die Isoform y^+ LAT1 den physiologisch wichtigeren ADMA-Exporter darstellt, da in y^+ LAT1-überexprimierten Oozyten beide Substrate beim Export gleich behandelt wurden: das injizierte Verhältnis von 10:1 kam dem im Extrazellulärpuffer gefundenen äußerst nahe.

4.3 Die intrazelluläre ADMA-Konzentration steigt zeitabhängig bei Entzug von Austauschsubstraten für die Transporter

Da nun die basischen Aminosäuretransporter der Endothelzellen bekannt und ihre ADMA-Exportaktivität festgestellt wurde, konnte nun auch eine Transporterhemmung in den Zellen hervorgerufen werden. Dafür wurden alle Aminosäuren aus dem Extrazellulärraum entfernt, die als potenzielle Austauschsubstrate dienen konnten. Weiterhin wurde als Extrazellulärmedium eine modifizierte physiologische Locke's Lösung, die keine Natriumionen enthielt, verwendet, da diese zusammen mit exportierten neutralen Aminosäuren möglicherweise einen Antrieb des natriumabhängigen Systems y^+L zur Folge gehabt hätten.

Die Frage nach der Viabilität der Zellen, die in der Locke's Lösung ohne Natrium inkubiert wurden, konnte durch zwei experimentell unterschiedliche Ansätze beantwortet werden: die Methode der Trypanblaufärbung zeigte ebenso wie die Lumineszenzmessung des ATP-Gehaltes, dass die EA.hy926-Zellen in Locke's Lösung ohne Natrium vital waren.

Bei einem Entzug von Natrium und Aminosäuren aus dem Extrazellulärmedium und damit einhergehend einem Entzug von Austauschsubstrat für die Membrantransporter konnte eine zeitabhängige, intrazelluläre Anreicherung endogen produzierten ADMAs in EA.hy926-Endothelzellen beobachtet werden (Abb. 10). Dieses wurde über die Zeit hinweg intrazellulär durch Proteindegradation weiter freigesetzt, konnte allerdings nicht mehr aus der Zelle hinaus exportiert werden. Wurde den Zellen als Austauschsubstrat die basische Aminosäure L-Ornithin in Locke's Lösung ohne Natrium angeboten, blieb die intrazelluläre ADMA-Konzentration zu jedem Zeitpunkt konstant. Im Gegenzug stieg der ADMA-Spiegel

im Extrazellulärpuffer zeitabhängig an, was für einen ADMA-Export in den Extrazellulärraum im Austausch mit dem außen zugesetzten L-Ornithin spricht.

Bei Entzug von Austauschsubstrat und Natrium war bei den primären Endothelzellen (HUVEC, HCAEC, HCMEC) gleichfalls eine Tendenz zur zeitabhängigen, intrazellulären ADMA-Akkumulation aufgrund einer Transporterhemmung zu beobachten (Abb. 11). Die Höhe der intrazellulären ADMA-Spiegel variierte hierbei in HUVECs und HCMECs stark. Dies mochte mit ihrer Kultivierung unter Zellkulturbedingungen und/oder dem Alter der Zellen zusammenhängen, da auffiel, dass jeweils die Passage mit den jüngsten Zellen die geringste ADMA-Konzentration aufwies. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Alter von Patienten und deren Plasma-ADMA-Spiegel wurde bereits in mehreren Studien angedeutet (Bode-Böger et al., 2003; Kielstein et al., 2003).

4.4 Die intrazelluläre ADMA-Konzentration steigt nach Herunterregulation des Systems γ^L

Da die bisherigen Ergebnisse eine erhebliche Beteiligung des Systems γ^L am physiologischen ADMA-Export implizierten, wurde unter siRNA-Einsatz die Translation der γ^L LAT1 und -2-mRNA gehemmt und die mRNA abgebaut. Dies sollte eine Herunterregulation des Systems bewirken und seinen Einfluss auf den ADMA-Export zeigen.

Es wurde hierfür mit den zuvor ermittelten siRNA- und Transfektionsmittelmengen transfiziert und nach der Isolation der Gesamt-RNA mit Hilfe der qRT-PCR nach der minimalsten Expression gesucht. Zudem wurde die Abnahme der Membranproteine indirekt durch einen [3 H]-L-Argininflux bestätigt, da kommerziell kein ausreichend gut funktionierender Antikörper für einen direkten Proteinnachweis erhältlich ist.

4.4.1 Die Herunterregulation der einzelnen Isoformen γ^L LAT1 und -2 bestätigt die Dominanz des γ^L LAT2-Membranproteins in EA.hy926-Zellen

Nachdem das Protokoll zur Transfektion optimiert und die aussichtsreichste siRNA-Menge bestimmt worden war, sollten in EA.hy926-Endothelzellen die Systeme

y^+ LAT1 und -2 einzeln herunterreguliert werden, um den Einfluss der einzelnen Isoformen auf den ADMA-Export festzustellen. Hierbei zeigte sich mit Hilfe der qRT-PCR, dass der siRNA-vermittelte Abbau der mRNA einer Isoform keine Auswirkungen auf die Expression der jeweils anderen Isoform hatte (Abb. 17). Dies sprach für die hohe Spezifität der verwendeten siRNA.

Die Hemmung der Isoformen des Systems y^+ L hatte bei keiner Anwendung irgendeiner siRNA eine Auswirkung auf die Expression der DDAH-Isoformen (Abb. 18). Ein solcher hätte die Antwort auf die Frage nach dem Einfluss von y^+ L auf die intrazelluläre ADMA-Elimination verfälschen können.

Der [3 H]-L-Arginininfluxversuch zeigte nach der Herunterregulation der einzelnen Isoformen auch auf Aktivitätsebene, dass relativ mehr der Isoform y^+ LAT2 in EA.hy926-Zellen zur Argininaufnahme beitrug als y^+ LAT1, was bereits durch die prominentere Expression von y^+ LAT2 angedeutet wurde (Abb. 5, 19 und 20).

4.4.2 Die Herunterregulation des Systems y^+ L hat einen verminderten ADMA-Export zur Folge

Hier wurde die Translation beider Membranproteine zugleich mittels siRNA herunterreguliert, um die Bedeutung des Systems y^+ L für den ADMA-Export in EA.hy926-Endothelzellen zu bestimmen.

Die qRT-PCR und der [3 H]-L-Arginininflux bestätigte die Verringerung der mRNA bzw. die Reduktion der y^+ LAT-vermittelten Transportaktivität (Abb. 21 und 22).

Die unterschiedlichen Gruppen (Zellen mit siRNA gegen y^+ L, non target-siRNA und unbehandelte Zellen) wurden weiterhin unter ADMA-Akkumulationsbedingungen kultiviert, was einen Entzug von Natriumionen und Aminosäuren, die als Austauschsubstrat fungieren konnten, beinhaltete. Unter dieser Behandlung zeigten alle drei unterschiedlich behandelten Zellgruppen ähnlich hohe, intrazelluläre ADMA-Spiegel und es war zudem wenig ADMA im Extrazellulärmedium der Zellgruppen messbar (Abb. 23, -).

Der ADMA-Export nach 5-minütigem Zusatz von Natriumionen und L-Leucin in den unbehandelten und mit non target-siRNA transfizierten Zellen war durch eine ähnliche Menge exportierten ADMAs im Extrazellulärraum gekennzeichnet (Abb. 23, +). Dieses konnte nur durch das in diesen Zellen unveränderte System y^+ L dorthin gekommen sein, da zu dessen Funktion ein Natriumgradient und eine neutrale

Aminosäure als Austauschsubstrat präsent sein müssen. Die in dieser Zeit exportierte ADMA-Konzentration betrug 9,3 bzw. 11,6 μM . Die Zellen, deren $\gamma^{\text{L}}\text{LAT1}$ und -2 durch die Behandlung mit siRNA verringert wurden, konnten hingegen nur 4,1 μM ADMA in den Extrazellulärraum exportieren (Abb. 23, +, si). Die weitaus höhere Konzentration (10,4 μM ADMA) wurde im Lysat der Zellen gemessen. Dies zeigt eine verringerte ADMA-Exportkapazität der $\gamma^{\text{L}}\text{LAT}$ -herunterregulierten Zellen.

4.4.3 Die Herunterregulation des Systems γ^{L} in primären humanen Umbilikalvenenendothelzellen

Nach den bisherigen Ergebnissen wäre eine analoge Untersuchung der ADMA-Exporteffizienz in primären Endothelzellen eine aufschlussreiche Ergänzung. Die Behandlung mit siRNA zeigte sich vielversprechend, da sich bei den verwendeten HUVECs das System γ^{L} ebenso effektiv herunterregulieren ließ wie zuvor in den EA.hy926-Endothelzellen. Leider konnte kein nachfolgender ADMA-Exportversuch durchgeführt werden, da die nach einer HUVEC-Isolation zur Verfügung stehende Zellanzahl weit unter der für einen Transportversuch zum Nachweis der Proteinverringerng und additiv für einen ADMA-Exportversuch lag. Letzterer wird zudem mittels HPLC ausgewertet und erfordert eine relativ große Zellanzahl, um verlässliche Ergebnisse zu liefern.

Möglich wäre eine Reduktion des Umfangs des Experiments, indem nach der Transfektion nur der ADMA-Exportversuch und anschließende HPLC-Analyse durchgeführt würden. Allerdings könnte die Transfektionseffizienz bei unklaren Resultaten nicht rückwirkend überprüft werden.

4.5 Eine intrazellulär gesteigerte ADMA-Konzentration hat keinen Einfluss auf die Produktion bioaktiven NOs

Die bisher erzielten Ergebnisse zeigten, dass es durch die Hemmung der Aktivität basischer Aminosäuretransporter möglich war, einen intrazellulären ADMA-Anstieg zu bewirken, der verglichen mit Zellen mit funktionierenden Transportern 2- bis 2,5-fach erhöht war. Seit Jahren werden erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen in wissenschaftlichen Publikationen mit Erkrankungen wie koronare Herzkrankheiten, Atherosklerose, Bluthochdruck und Endotheldysfunktion korreliert (siehe auch Kap. 1.3.1 Klinische Relevanz erhöhter ADMA-Plasmaspiegel). Bei all diesen Studien wird postuliert, dass ADMA aufgrund seiner NO Synthase-hemmenden Eigenschaft einen Beitrag zu einer verminderten NO-Produktion leistet, was sich letztendlich durch das Ausbleiben der protektiven Effekte des Stickstoffmonoxids in den unterschiedlichen Leiden manifestiert. Bisher konnte die kompetitive NOS-Hemmung allerdings nur am isolierten Enzym von Cardounel und Kollegen nachgewiesen werden (Cardounel et al., 2007). Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen erhöhter intrazellulärer ADMA-Konzentrationen auf die NO-Produktion in der lebenden Zelle zu untersuchen.

Das Prinzip zur Messung der produzierten Menge bioaktiven Stickstoffmonoxids macht sich den Gaszustand des NOs zunutze. Dieses diffundiert in den Überstand der NO-produzierenden Zellen, der auf Reporterzellen gegeben wird, um in diesen die Produktion des second messengers cGMP zu stimulieren. Es handelt sich hierbei daher um eine NO-induzierte cGMP-Produktion. Die proportional zur NO-Menge gebildete Menge an cGMP wird weiterhin in einem Radioimmunoassay mit Hilfe eines Antikörpers gegen cGMP in einem Präzipitationsschritt detektiert und gemessen.

Die Untersuchung des Einflusses eines erhöhten intrazellulären ADMA-Spiegels auf die NO-Produktion, die durch Hemmung der Transportsysteme y^+ und y^+L erreicht werden sollte, machte eine Inkubationslösung ohne Natrium erforderlich. Der Grund hierfür liegt in der teilweisen Natriumabhängigkeit des y^+LAT -vermittelten Transports, der zur intrazellulären ADMA-Akkumulation unterbunden werden musste. Zunächst musste daher geprüft werden, ob der Assay auch in einer Inkubationslösung ohne Natrium einwandfrei war. Dazu wurden EA.hy926-Zellen 92 min lang mit L-Arginin

inkubiert und ihnen entweder eine physiologische Natriumkonzentration, überhaupt kein Natrium oder nur in den letzten 2 min zur NO-Produktion die physiologische Natriumkonzentration angeboten wurde (Abb. 29). Das Resultat zeigte, dass bei einer Inkubation der Zellen ohne Natrium eine Hemmung der NO-Synthese eintrat, die nach einer 2-minütigen Gabe von Natrium in physiologischer Konzentration in einer Regeneration der NO-Produktion resultierte. Diese Erkenntnis hatte zur Folge, dass der Versuch zur Prüfung des Einflusses von intrazellulär akkumuliertem ADMA unter Zugabe von Natrium erfolgen musste, um die vollständige Zuverlässigkeit des Assays zu gewährleisten. Die intrazellulären L-Arginin- und ADMA-Konzentrationen der Zellen, die sich in den unterschiedlich behandelten Zellen nicht wesentlich unterschieden, stellten keinen Einfluss auf die NO-Synthese dar.

Für diese Form der NO-Produktionsmessung wurde das Kalziumionophor A23187 verwendet, um einen Kalziumeinstrom in die Zellen hervorzurufen. In einigen biologischen Systemen erfordert eine Stimulation durch A23187 sowohl die Anwesenheit von Kalzium- als auch die von Natriumionen (Reed, 1982). Die Literatur bietet weitere Hinweise auf eine Abhängigkeit dieses Kalziumionophors von der Anwesenheit von Natriumionen: Kanno et al. fanden eine erhöhte Amylasesekretion pankreatischer Drüsenzellen wenn von außen Kalziumionen und A23187 mit steigenden Konzentrationen an Natriumionen angeboten wurden (Kanno et al., 1977). Eine weitere Entdeckung wurde 2004 an dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* gemacht. Ein Kalziumanstieg, experimentell durch A23187 vermittelt, bewirkt morphologische Veränderungen, die im Austritt des Parasiten aus der Wirtszelle resultieren. Arrizabalaga und Kollegen fanden eine Mutante des Parasiten mit einer veränderten Antwort auf das Kalziumionophor, dessen betroffenes Gen für das Homolog eines Na^+/H^+ -Austauschers auf der parasitären Plasmamembran kodierte (Arrizabalaga et al., 2004). Dies stellte einen direkten genetischen Hinweis auf die Rolle der Na^+/H^+ -Austauscher für die Kalziumhomeostase dar. Der mutierte Parasit zeichnete sich durch eine Resistenz gegen A23187-Stimulation aus, die auf eine erhöhte intrazelluläre Kalziumionen-Konzentration zurückgeführt wurde. Daher mag die Natriumabhängigkeit des Assays an den Na^+/H^+ -Austauschern liegen, die bereits in humanen Endothelzellen gefunden wurden (Ghigo et al., 1988). Gleichzeitig weist die Literatur auf eine Abhängigkeit der Kalziumaufnahme von einem Natriumgradienten hin (Blaustein and Lederer, 1999). Bei einer Inkubation der Zellen in natriumfreier Lösung könnte daher der

Natriumgradient gestört sein und somit die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch die Aufnahme von Kalzium verhindern (Teubl, 1999). Hierzu könnten weitergehende Experimente mit fluoreszierenden Kalziumchelate-Komplexbildnern (wie beispielsweise Fura-2) durchgeführt werden, durch die die Lokalisation des Kalziums optisch ermittelt werden könnte.

Kapitel 4.3 beschreibt die zeitabhängige intrazelluläre Anreicherung von ADMA aufgrund der Hemmung der Membrantransporterfunktion durch Entzug von Aminosäuren. Nun sollte unter diesen Bedingungen die inhibitorische Wirkung von ADMA auf die Produktion bioaktiven Stickstoffmonoxids in der lebenden Zelle untersucht werden.

Hierzu wurde nach einer anfänglichen 90-minütigen ADMA-Akkumulation der cGMP-Spiegel und damit die Produktion bioaktiven NOs gemessen (Abb. 30). Eine hieraus resultierende, intrazelluläre ADMA-Konzentration von knapp 20 μM genügte im Vergleich mit der cGMP-Produktion der Zellen der Positivkontrolle nicht, um eine kompetitive Hemmung der endothelialen NO-Synthase zu dokumentieren. Nach 5 min erlaubtem Transport über das System y^+L in Folge der Akkumulation sank der ADMA-Spiegel innerhalb der Zellen auf Werte, die mit denjenigen der Positivkontrolle vergleichbar waren (Abb. 30, unten links). Es konnte jedoch auch keine Veränderung der NO-Produktion ermittelt werden, da bei Leucinzugabe nicht nur die basische Aminosäure ADMA, sondern auch das ebenso basische Substrat der eNOS L-Arginin aus der Zellen depletiert wurde, was an dem ähnlichen L-Arginin/ADMA-Verhältnis ersichtlich wird (26:1 bei Transporthemmung im Vergleich zu 33:1 bei 5 min erlaubtem Export).

Dieses Ergebnis zeigt, dass unter den hier künstlich herbeigeführten, intrazellulären ADMA-Konzentrationen von 20 μM keine Reduktion der NO-Produktion durch die endotheliale NO-Synthase erfolgte. Eine intrazelluläre L-Argininkonzentration von 535 μM war in den Zellen weiterhin vorhanden und reichte aus, um die NO-Synthase ausreichend mit Substrat zu versorgen. Die Messungen der vorhandenen Aminosäurekonzentrationen machen deutlich, dass erst eine drastische intrazelluläre ADMA-Erhöhung erfolgen muss, um einen Einfluss auf die NO-Synthase zu haben. Dies könnte beispielsweise bei pathologisch veränderten Membrantransportern geschehen, die das intrazelluläre Arginin:ADMA-Verhältnis noch weiter zu Gunsten des ADMA verschieben würden. Desweiteren könnte eine erhöhte Aktivität des L-

Arginin abbauenden Enzyms Arginase zu einem verringerten Arginin:ADMA-Verhältnis beitragen. Hinweise auf einen nicht unerheblichen Einfluss der Arginase auf die Substratverfügbarkeit für die NO-Synthase sind bereits belegt (Berkowitz et al., 2003; Durante et al., 2007). Auch ein vermehrter Proteinabbau kann zusätzlich zu einer erhöhten ADMA-Freisetzung beitragen. Dieser kommt bei unterschiedlichen körperlichen Traumata, Krebserkrankungen, einem signifikanten Verlust von Körpermasse und auch bei septischen Zuständen vor (Hasselgren et al., 1997). Um das Ergebnis der hierbei verwendeten immortalisierten EA.hy926-Zellen zu ergänzen, wurde in einem translationalen Ansatz der ADMA-Export humaner Blutzellen mit der Endothelfunktion korreliert.

4.6 ADMA-Exportmessung an humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Es wurde in Zusammenarbeit mit der 2. Medizinischen Klinik eine Studie begonnen, die die Effizienz des γ ⁺LAT-vermittelten ADMA-Exports aus humanen PBMCs mit der Endothelfunktion korrelieren sollte. Hierzu wurde zunächst ein Protokoll zur Isolation von PBMCs aus humanem Blut und einer nachfolgenden ADMA-Exportmessung etabliert und validiert, da Endothelzellen von Patienten nicht zu bekommen waren. Zudem wurde die Messung des Aminosäureexports an humanen PBMCs bereits in der Arbeitsgruppe erprobt.

Die ADMA-Messung durch die HPLC bewegte sich dabei an der unteren Detektionsgrenze, jedoch machte die Validierung der Ergebnisse mittels Doppelbestimmung deutlich, dass Unterschiede zwischen den Patienten nicht auf falsche Messergebnisse durch die HPLC-Anlage oder eine ungleiche experimentelle Durchführung zurückzuführen waren, sondern dass die Effektivität des ADMA-Exports tatsächlich von der Versuchsperson abhing (Abb. 32). Zudem wurde zum ADMA- der L-Argininexport bestimmt, um die Frage zu beantworten, ob sich beide Aminosäuren beim Export ähnlich verhalten würden.

Die bisher überschaubare Anzahl der Patienten machte es leicht, unterschiedliche Auswertungs- und Darstellungsweisen zu applizieren.

Zunächst muss eine Ungenauigkeit bei der Feststellung der Ein- und Ausschlusskriterien in der Studie festgestellt werden: es wurde prospektiv festgesetzt, dass in erster Näherung zunächst die beiden extremsten Patientengruppen auf Unterschiede im ADMA-Export untersucht werden sollten. Hierbei sollten Patienten mit Stenosen in allen drei großen Herzgefäßen solchen ohne Stenosen gegenüber gestellt werden. Hierbei wurden Patienten mit arteriosklerotischen Stenosen ausgewählt, da diese einen Hinweis auf eine Endotheldysfunktion bietet. Die wesentliche Frage hierbei war, ob Patienten mit Stenosen eine Pathologie im ADMA-Export aufwiesen und ob die Patienten ohne Stenosen jeweils die Kontrollgruppe darstellten, die einen normalen ADMA-Export zeigte. Dieser wichtige Punkt stellte sich mit zunehmendem Verlauf der Studie als falsch heraus, da sich in beiden Gruppen unterschiedliche ADMA-Exportaktivitäten

fanden (Abb. 35 – 37). Weiterhin kann eine Stenose viele verschiedene Ursachen haben und muss nicht in erhöhter ADMA-Produktion oder gar verringertem ADMA-Export begründet liegen. Als Ursachen einer Blutgefäßstenose gelten im Allgemeinen eine Verkalkung der Arterien (Arteriosklerose) oder eine Entzündung der Gefäßwand. Eine große Bedeutung bei arteriosklerotischen Prozessen wird der endothelialen Dysfunktion beigemessen, die wiederum eine Folge der reduzierten Synthese des Stickstoffmonoxids durch das Endothel ist (Davignon and Ganz, 2004; Busse and Fleming, 1996). Die reduzierte NO-Synthese könnte ursächlich durch einen intrazellulär erhöhten ADMA-Spiegel hervorgerufen werden. Diese Kausalkette bleibt jedoch unbestätigt und trifft keineswegs unweigerlich zu. Ein Beispiel für eine Endothelfunktionsstörung, die in dieser Studie unentdeckt bleibt, ist die seltene Prinzmetal-Angina (Prinzmetal et al., 1959). Diese zeichnet sich durch eine schwerwiegende Endotheldysfunktion ohne arteriosklerotische Veränderungen aus. Die Betroffenen leiden unter belastungsunabhängigen Koronarspasmen, die durch eine vorübergehende Ischämie des Herzmuskels ausgelöst wird, und weisen oftmals keine typischen kardiovaskulären Risikofaktoren auf.

Aufgrund der oben genannten problematischen Definition der Patientengruppen wurden alle Daten doppelt ausgewertet: erstens im Hinblick auf die vorher festgelegten Kriterien und zweitens – soweit vorhanden - aufgrund der Endothelfunktion der Patienten. Diese wurde durch Messung der Fluss-vermittelten Dilatation (flow-mediated dilation, FMD) bestimmt, die jedoch nicht bei allen Patienten durchgeführt wurde. Darin liegen die variablen n-Zahlen begründet: zunächst mussten die PBMCs isoliert, der ADMA-Exportversuch durchgeführt und die Daten per HPLC gemessen werden, dann konnten die Resultate entweder nach den vorher festgelegten Kriterien oder nach der Endothelfunktion zugeordnet werden.

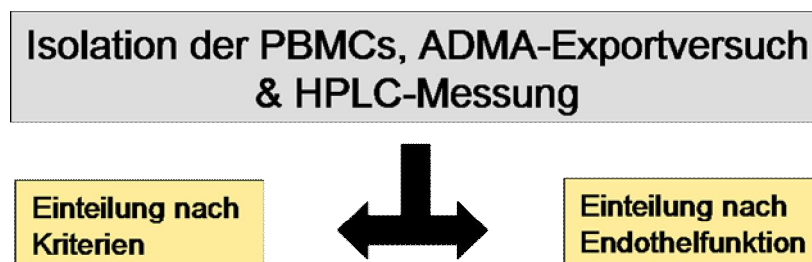


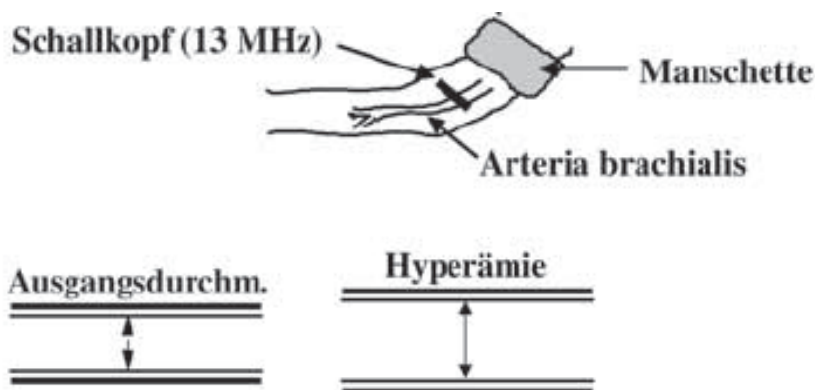
Abb. K: **Gruppeneinteilung zur Auswertung der Patientenstudie.** Um eine eindeutige Beantwortung der Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen Endothelfunktion und ADMA-Export zu erzielen, wurden die Daten der Patienten nicht nur nach den vorher

festgelegten Kriterien, sondern zusätzlich nach ihrer Endothelfunktion eingeteilt und ausgewertet.

4.6.1 Methodenkritik an der Messung der Fluss-vermittelten Dilatation (flow-mediated dilation, FMD)

In der Klinik dient die Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation als Maß für eine möglicherweise vorliegende Endotheldysfunktion. Die Methode, diese endothelabhängige Vasodilatation nicht-invasiv mittels Ultraschall zu erfassen, ist weit verbreitet und etabliert (Celermajer et al., 1992; Fronck and Allison, 2008; Corrado et al., 2009).

Dabei wird die prozentuale Zunahme der Arteria brachialis nach einer physiologischen Stimulation der endothelialen NO-Synthase durch einen gesteigerten Blutvolumenfluss mittels eines hochauflösenden Ultraschalls gemessen. Zunächst wurde 5 – 10 min der Ruhepuls gemessen, was zudem einer Eingewöhnungsphase des Patienten an die Situation entsprach. Dann wurde die Blutdruckmanschette 4 – 5 min lang auf 40 mm Hg aufgepumpt und damit eine Ischämie simuliert. Die Hyperämie wurde zuletzt durch eine schnelle Öffnung der Manschette induziert, die eine flussvermittelte Vasodilatation der Widerstandsgefäße zur Folge hatte. Dies resultierte in einer Steigerung des Blutvolumenflusses im Bereich der Leitungsarterie, steigerte die Schubspannung und führte über eine vermehrte Stickstoffmonoxidfreisetzung zur Dilatation der Arteria brachialis. Etwa 60 Sekunden nach Öffnung der Manschette erreichte die endothelabhängige Vasodilatation ihr Maximum.



$$\text{FMD} = \frac{\text{Hyperämie} - \text{Ausgangsdurchm.}}{\text{Ausgangsdurchmesser}} \times 100$$

Abb. L: Schematische Darstellung der nichtinvasiven Bestimmung der peripheren Endothelfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. (aus: „Flußvermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert“, Frick et al., Journal für Kardiologie, 2002)

Folgende Faktoren können einen Einfluss auf die oben beschriebene Methode ausüben (Frick et al., 2002):

- Die Messung sollte bei allen Probanden möglichst zur gleichen **Tageszeit** durchgeführt werden, da verschiedene Studien bereits nachgewiesen haben, dass die FMD bei jungen, gesunden Probanden in den Morgenstunden signifikant geringer ist als am Nachmittag.
- Die **Raumtemperatur** scheint einen Einfluss auf die FMD zu haben, daher werden FMD-Messungen international zumeist in klimatisierten Räumen vorgenommen.
- Weder am Vorabend noch am Untersuchungstag sollten **vasoaktive Medikamente** eingenommen werden.
- Am Untersuchungstag sollte ebenso auf den Konsum von **Kaffee oder Tee** verzichtet werden, da beide zu einer milden Stimulation des autonomen Nervensystems führen und daher möglicherweise auch Einfluss auf den Gefäßtonus und die FMD nehmen.
- Weiterhin ist das **Rauchen** am Untersuchungstag untersagt, da es zu einer akuten Verminderung der FMD führt.
- Da gegensätzliche Untersuchungsergebnisse bezüglich des Einflusses von fett- oder zuckerreichen **Mahlzeiten** auf die Messung existieren, sollten diese am nüchternen Patienten durchgeführt werden.
- Die **Zyklusphase** der Frau sollte bei FMD-Messung Berücksichtigung finden, da die Werte in der folliculären und lutealen, sowie unter Einnahme von Östrogenen erhöht sein können.
- Der individuelle **Brachialisdurchmesser** beeinflusst aus geometrischen und mathematischen Gründen die FMD (Celermajer et al., 1992). Zur Lösung dieses Problems könnte eine FMD-Korrektur nach der Größe des Brachialisdurchmessers durchgeführt oder auf ähnliche Ausgangsdurchmesser der Probanden geachtet werden.

- Eine zwingende Notwendigkeit stellt die bereits von Celermajer und Kollegen beschriebene, 10-minütige **Ruhephase** vor der Messung dar. Diese sollte liegend in einer entspannten Atmosphäre verbracht werden. Ebenso ist eine ruhige Umgebung während der Messung unerlässlich.

Trotz der aufgeführten Unsicherheiten der Methode ist sie als nicht-invasive Endothelfunktionsbestimmung anerkannt und liefert in zahlreichen Studien Korrelationen mit Krankheitsbildern, die auf eine gestörte Endothelfunktion zurückzuführen sind. Die meisten Faktoren, die die Messung beeinflussen, können einfach eliminiert werden durch die angemessene Wahl der Räumlichkeiten, durch eine begrenzte Anzahl an Personen, die die Messungen durchführen und durch eine möglichst homogene Probandengruppe. Vermutlich sinkt zudem ab einer gewissen Anzahl an Patienten die Wahrscheinlichkeit, dass sich einzelne individuelle Variationen bei der Auswertung bemerkbar machen.

Im Folgenden werden die ersten Ergebnisse der Studie unter dem Aspekt zweier Auswertungen diskutiert:

4.6.2 Innerhalb der Studiengruppen existierten keine Expressionsunterschiede der Membrantransporter

Das Transporterprofil der PBMCs bestärkt die Wahl dieser Zellen für die Studie, da es dem Profil der zuvor verwendeten EA.hy926-Endothelzellen weitestgehend entspricht. Die Auswertung der Expressionen der Membrantransporter der einzelnen Patientenproben ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Allgemeinen konnte eine Tendenz der Reduktion der mRNA-Expressionen von den jungen, gesunden Probanden (Außengruppe) zu den Patienten aus der Klinik erkannt werden, die vermutlich auf dem Altersunterschied beruht (Abb. 33 und 34). Es konnte bereits bei anderen Membrantransportern eine altersabhängige Expression festgestellt werden (Bannon, 1992). Dass diese Tendenz in den beiden Gruppeneinteilungen - derjenigen nach den vorher festgelegten Kriterien und derjenigen nach FMD - besteht, verstärkt die Vermutung, dass es sich um eine solche altersabhängige mRNA-Expressionsreduktion handelt.

4.6.3 Es existierten drei Ausprägungen der γ^+ LAT-vermittelten ADMA-Exportaktivität in humanen PBMCs

Bei der bisher überschaubaren Anzahl an Patienten konnte nach einem eingehenden Blick auf die Exportdaten der einzelnen Personen zwei wichtige Schlüsse gezogen werden:

Erstens scheint es drei unterschiedliche ADMA-Exportaktivitäten zu geben, die sich dem Betrachter durch den Unterschied zwischen dem ADMA-Gesamlexport und dem γ^+ LAT-vermittelten ADMA-Export erschließt. Ersterer wurde durch Zugabe der basischen Aminosäure L-Lysin bestimmt und zeigte den Export über die Transportsysteme γ^+ und γ^+L , da beide basische Aminosäuren als Austauschsubstrat akzeptieren. Der nur durch γ^+ LAT-vermittelte ADMA-Export wurde durch Zugabe der neutralen Aminosäure L-Leucin bestimmt, da dieses Transportersystem, nicht aber das System γ^+ , neutrale Aminosäuren als Austauschsubstrat akzeptiert. Die Exportaktivitäten zeigten, dass der Anteil an γ^+ LAT-vermitteltem ADMA-Export am Gesamlexport zwischen den Patienten variierte (Abb. 35 – 37). Es war ein vollständig durch γ^+ LAT-vermittelter ADMA-Export zu erkennen (Export gegen L-Lysin und L-Leucin identisch, siehe beispielsweise Abb. M). Weiterhin ein teilweise γ^+ LAT-vermittelter ADMA-Export, der erkennbar war durch einen im Vergleich zu L-Lysin ungefähr auf die Hälfte abfallenden ADMA-Export gegen L-Leucin (beispielsweise gezeigt in Abb. N). Die dritte ADMA-Exportmöglichkeit war ein kaum γ^+ LAT- oder vollständig γ^+ -vermittelter ADMA-Export, der sich durch einen dem Basalwert (ohne Aminosäuren bestimmt) ähnlichen ADMA-Export gegen L-Leucin zeigte (siehe Abb. O).

Diese drei unterschiedlichen ADMA-Exportaktivitäten korrelierten allerdings mit keinem bekannten klinischen Parameter, sodass es sich hierbei wohl um eine individuell unterschiedliche γ^+ LAT-Aktivität beim Export von ADMA handelte. Die Verifizierung der Messwerte der Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (beispielsweise an zwei oder drei verschiedenen Tagen) war nicht möglich. Allerdings würde dies eine interessante Ergänzung der Daten darstellen, da für Patienten, die einen permanent schlechten γ^+L -vermittelten ADMA-Export über eine größere Dauer aufwiesen, eine Supplementierung mit L-Arginin oder einer anderen basischen Aminosäure von Vorteil wäre (Siani et al., 2000). Damit würde der

Plasmagehalt an basischen Aminosäuren erhöht und intrazellulär gebildetes ADMA könnte die Zelle über das alternative Transportsystem y^+ verlassen und über die Niere aus dem Körper eliminiert werden können. Zudem könnte über eine Hemmung der Arginase das intrazelluläre Arginin:ADMA-Verhältnis zu Gunsten des L-Arginins verschoben werden, so dass für die NO-Synthase mehr Substrat zur Verfügung stünde (Bagnost et al., 2010). Eine kooperative Ergänzung zwischen der intrazellulären ADMA-Elimination und einer moderaten Arginasetätigkeit scheinen äußerst wichtig für die effektive Tätigkeit der NO-Synthasen zu sein (Holowatz, 2006).

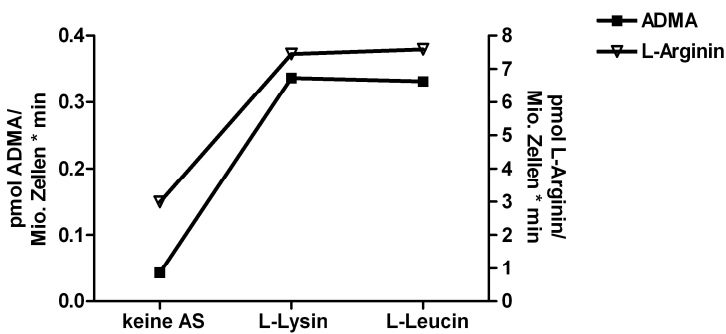


Abb. M: Beispiel eines vollständig y^+ LAT-vermittelter ADMA-Export. Dass ADMA nur über das System y^+L exportiert wird, ist an der gleichen ADMA-Menge zu erkennen, die sowohl mit L-Lysin (das Austauschsubstrat für y^+ und y^+L) als auch mit L-Leucin (Austauschsubstrat für y^+L) im Extrazellulärpuffer exportiert wurde.

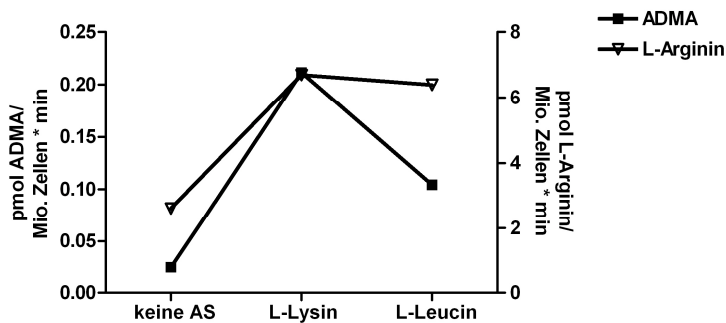


Abb. N: Beispiel eines teilweise y^+ LAT-vermittelter ADMA-Export. ADMA wird nur teilweise über das System y^+L exportiert, da mit L-Lysin als Austauschsubstrat für y^+L und y^+ mehr ADMA exportiert werden konnte als bei der ausschließlichen Arbeit des Systems y^+L , das mit L-Leucin als Austauschsubstrat funktioniert.

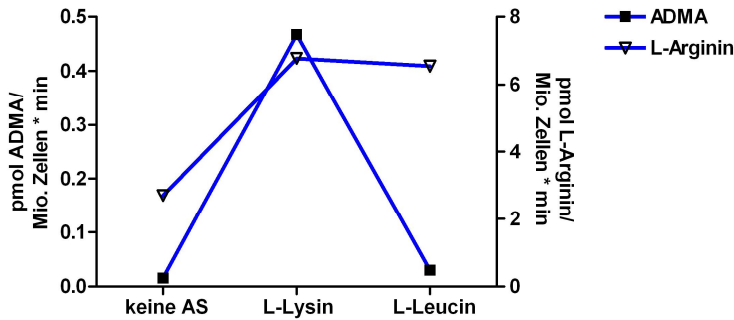


Abb. O: Beispiel eines kaum γ^+ LAT- oder vollständig γ^+ -vermittelter ADMA-Export. Dass ADMA nur über das System γ^+ exportiert wird, zeigt die ADMA-Menge, die mit L-Leucin als Austauschsubstrat exportiert wurde und sich auf dem Niveau des Basalwertes befand.

Beim Blick auf die Exportdaten der einzelnen Personen ergibt sich ein zweiter Schluss: das System γ^+ LAT scheint einen Unterschied zwischen L-Arginin und ADMA als Substrat zu machen. Der L-Argininexport schien in Anwesenheit des Substrats von γ^+ L (die neutrale Aminosäure L-Leucin) bei allen Patienten hauptsächlich über dieses System bewerkstelligt zu werden, während der ADMA-Export über γ^+ LAT wie oben beschrieben erheblich variieren konnte. Bei den unterschiedlichen Messungen der Transporteraktivität bei EA.hy926-Endothelzellen war ein solcher Unterschied in der Substratbehandlung durch das System γ^+ L bisher nicht aufgefallen.

Möglicherweise liegt dies an der prominenten Expression der Isoform γ^+ LAT1 bei den PBMCs und auch den anderen primären Endothelzellen im Vergleich zu den EA.hy926-Zellen (Abb. 5, 33 – 34). Diese Isoform stellte sich bei den Exportstudien an *X. laevis*-Oozyten als diejenige heraus, die L-Arginin und ADMA als Substrate gleich behandelte (Abb. 4). Hierbei wurde ein Arginin-ADMA-Gemisch im Verhältnis 10:1 in die Oozyten injiziert und der Extrazellulärpuffer nach Inkubation auf die exportierte L-Arginin- und ADMA-Menge analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Isoform γ^+ LAT1 keine Unterschiede bei der Substratbehandlung machte, da sich das zuvor injizierte Verhältnis der beiden Aminosäuren im Extrazellulärpuffer wiederfand. Dies legte den Schluss nahe, dass γ^+ LAT1 die physiologisch wichtige Isoform für den ADMA-Export darstellt. Diese Hypothese wurde durch die Studie unterstützt, da der Großteil der Patienten gleiche L-Arginin- und ADMA-Exporte zeigte. Der Frage nach der Existenz einer möglichen Präferenz eines Transportersystems oder gar eines Unterschieds zwischen den Isoformen eines Systems sollte mit Oozyten- und PBMC-Messungen weiter nachgegangen werden.

Dies könnte eine weitere wichtige Determinante zur effektiven ADMA-Elimination aus der Zelle darstellen.

4.6.4 Der Vergleich der Studiengruppen zeigte keine klinisch relevanten Unterschiede im ADMA-Export

Bei der Mittelung der ADMA-Exportdaten und der Patienteneinteilung in Stenose- und Nicht-Stenosegruppen konnten keine Unterschiede im ADMA-Export festgestellt werden. Die Patienten mit Stenosen und die Kontrollpatienten zeigten sich keinen Unterschied im ADMA-Export zwischen den Gruppen (Abb. 38). Die unterschiedlichen y^+ -vermittelten ADMA-Exportaktivitäten waren keiner Gruppe eindeutig zuzuordnen, weshalb sich der Verlauf der Kurven beider Gruppen ähnlich darstellte. Ebenso verhielt es sich bei der Einteilung der Patienten in solche mit guter und solche mit schlechter Endothelfunktion: da sich in beiden Gruppen Patienten mit gutem, teilweisem und schlechtem y^+ -vermittelten ADMA-Export befanden, ergab sich im Durchschnitt kein Unterschied des ADMA-Exports zwischen diesen Gruppen. Da der Standardfehler bei dieser Art der Auswertung noch recht groß war, wurde eine weitere Möglichkeit der Auswertung in Betracht gezogen, die die interindividuelle Variabilität der absoluten Zahlen normalisierte. Hierbei wurden jeweils der ADMA- bzw. der L-Arginin-Gesamtexport der einzelnen Patienten, der durch Zugabe von L-Lysin bestimmt wurde, auf 100 % normalisiert und die jeweiligen Basalwerte und y^+ -vermittelten Exportmengen relativ zum Gesamtexport berechnet (Abb. 39). Die Patientengruppe mit schlechter Endothelfunktion zeigte einen tendenziell schlechteren ADMA-Export, allerdings war dieser statistisch nicht signifikant (Abb. 39, unten links). Es sind weitere Patienten zu rekrutieren, um eine aussagekräftige Statistik durchführen zu können und damit die Frage nach der Korrelation eines verminderten ADMA-Exports mit einer Endotheldysfunktion beantworten zu können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, den physiologischen ADMA-Exporter aus der Zelle heraus zu bestimmen: mit Hilfe von *Xenopus laevis*-Oozyten konnten die Systeme y^+ und y^+ L als ADMA-Exporter

identifiziert werden. Eine Analyse der Expressionen der Membrantransporter in unterschiedlichen Endothelzellen zeigte die Präsenz des humanen basischen Aminosäuretransporters-1 (hCAT-1) und der beiden Isoformen des Systems γ^+L (γ^+LAT1 und -2). Bei Funktionsverlust der Transporter konnte gezeigt werden, dass sich ADMA zeitabhängig in der Zelle anreichert, und dass ein damit erzielter intrazellulärer ADMA-Anstieg um das 4-fache nicht ausreichte, um eine erkennbare Reduktion der NO-Produktion durch die endotheliale NO-Synthase zu erreichen.

Der translationale Ansatz zeigte bisher nur eine Tendenz zu einer Korrelation zwischen dem ADMA-Exportvermögen humaner PBMCs und der Endothelfunktion. Zudem deckte dieser eine hohe individuelle Variabilität des ADMA-Exportvermögens auf.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem Membrantransporter-vermittelten Export von asymmetrischem Dimethyl-L-Arginin (ADMA) aus der Endothelzelle. Da ADMA-Plasmakonzentrationen mit Erkrankungen wie koronaren Herzkrankheiten, Atherosklerose, Bluthochdruck und Endotheldysfunktion in Verbindung gebracht werden, ist ein effektiver ADMA-Export aus der Zelle heraus unabdingbar. Um den Mechanismus hierfür aufzuklären, wurden die immortalisierte Endothelzelllinie EA.hy926 und weitere primäre Endothelzellen (humane Umbilikalvenenendothelzellen und Endothelzellen der großen und kleinen Herzgefäße) auf die Expression basischer Aminosäuretransporter mittels einer qRT-PCR hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle getesteten Endothelzellen die Aminosäuretransporter hCAT-1, y^+LAT1 und y^+LAT2 exprimierten. Basierend auf ADMA-Exportdaten, die mit entsprechenden Transporter-überexprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten gewonnen wurden, wurde festgestellt, dass alle drei Membrantransporter ADMA exportieren konnten. Der physiologisch wichtige Exportweg für intrazellulär anfallendes ADMA scheint dabei der via y^+L zu sein, da es sich hierbei um einen aktiven Exportmechanismus handelt, der im Gegentransport von im humanen Plasma reichlich vorhandenen neutralen Aminosäuren und Natriumionen den nach innen gerichteten Natriumgradienten ausnutzt. Die Wichtigkeit des Membrantransportes für die Kontrolle intrazellulärer ADMA-Konzentrationen wurde *in vitro* durch Entzug von extrazellulären Austauschsubstraten und einer daraus resultierenden Blockade der Transportfunktion gezeigt. Hierbei wurde innerhalb von zwei Stunden ein 2,5-facher Anstieg der intrazellulären ADMA-Konzentration festgestellt, die bei Präsenz von Austauschsubstrat für die Transporter nicht auftrat. Die Relevanz der y^+LATs für den ADMA-Export wurde durch Herunterregulation dieser Proteine mittels siRNA sichtbar: Unter diesen Bedingungen konnte ADMA auch in Anwesenheit von Austauschsubstrat für das System y^+L weniger effektiv exportiert werden. Eine wichtige Aufgabe des humanen Endothels ist die Bildung bioaktiven Stickstoffmonoxids, das unter anderem eine Vasodilatation der Gefäße bewirkt. Für diese NO-Synthese wird L-Arginin als Substrat von der endothelialen NO-Synthase

benötigt. ADMA stellt einen kompetitiven Inhibitor dar, dessen erhöhtes intrazelluläres Vorkommen möglicherweise hemmend auf die NO-Synthase wirken könnte. Es konnten hier allerdings keine Auswirkungen eines um das 4-fache gestiegenen, intrazellulären ADMA-Spiegels auf die Tätigkeit der endothelialen NO-Synthase festgestellt werden. Möglicherweise bedarf es eines noch weiter zu Gunsten des ADMA verschobenen, intrazellulären L-Arginin:ADMA-Verhältnisses, um eine Hemmung der NO-Synthase festzustellen. Dies könnte bei einem pathologischen Transporterausfall eintreten, der intrazellulär permanent höhere ADMA-Konzentrationen zur Folge hätte. Des Weiteren hätte ein Anstieg der Arginasetätigkeit und damit einhergehend ein Substratdefizit für die NO-Synthase den gleichen Effekt. Der translationale Ansatz mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten aus der 2. Medizinischen Klinik zeigte die Tendenz einer Korrelation zwischen dem ADMA-Exportvermögen und der Endothelfunktion und brachte zudem die Erkenntnis eines individuell äußerst variablen ADMA-Exportvermögens zutage.

6. Literaturverzeichnis

- Albritton, LM, JW Kim, L Tseng, and JM Cunningham. 1993. "Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses." *Journal of virology* 67 (4) (April): 2091-6.
- Anderstam, B, K Katzarski, and J Bergström. 1997. "Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients." *Journal of the American Society of Nephrology* 8 (9): 1437-1442.
- von Andrian, U. 1991. "Two-Step Model of Leukocyte-Endothelial Cell Interaction in Inflammation: Distinct Roles for LECAM-1 and the Leukocyte 2 Integrins in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (17) (September 1): 7538-7542.
- Antoniades, C, C Shirodaria, P Leeson, A Antonopoulos, N Warrick, T Van-Assche, C Cunningham, D Tousoulis, R Pillai, C Ratnatunga, C Stefanadis, and KM Channon. 2009. "Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis." *European Heart Journal* 30 (9): 1142-1150.
- Armstrong, MD, and U Stave. 1973. "A study of plasma free amino acid levels. II. Normal values for children and adults." *Metabolism: clinical and experimental* 22 (4) (April): 561-9.
- Arrizabalaga, G, F Ruiz, S Moreno, and JC Boothroyd. 2004. "Ionophore-resistant mutant of *Toxoplasma gondii* reveals involvement of a sodium/hydrogen exchanger in calcium regulation." *The Journal of Cell Biology* 165 (5): 653-62.
- Ausprunk, DH, and J Folkman. 1977. "Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis." *Microvascular Research* 14 (1) (July): 53-65.
- Bagnost, T, L Ma, RF da Silva, R Rezakhaniha, C Houdayer, N Stergiopoulos, C André, Y Guillaume, A Berthelos, and C Demougeot. "Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension." *Cardiovascular Research* 87 (3): 569-577.
- Bannon, MJ. 1992. "Dopamine Transporter mRNA Content in Human Substantia Nigra Decreases Precipitously with Age." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (15) (August 1): 7095-7099.
- Barber, RD, DW Harmer, RA Coleman, and BJ Clark. 2005. "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." *Physiological genomics* 21 (3): 389-95.

- Bartlett, DW, and ME Davis. 2006. "Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging." *Nucleic acids research* 34 (1): 322-33.
- Bauch, C, and F Verrey. 2002. "Apical heterodimeric cystine and cationic amino acid transporter expressed in MDCK cells." *American journal of physiology. Renal physiology* 283 (1) (July): F181-9.
- Berkowitz, DE, R White, D Li, KM Minhas, A Cernetich, S Kim, S Burke, AA Shoukas, D Nyhan, HC Champion, and JM Hare. 2003. "Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels." *Circulation* 108 (16): 2000-6.
- Bertran, J, A Werner, ML Moore, G Stange, D Markovich, J Biber, X Testar, A Zorzano, M Palacin, and H Murer. 1992. "Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12): 5601-5605.
- Blaustein, MP, and WJ Lederer. 1999. "Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications." *Physiological Reviews* 79 (3) (July 1): 763-854.
- Bode-Böger, SM, J Muke, A Surdacki, G Brabant, RH Böger, and JC Frölich. 2003. "Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years." *Vascular medicine (London, England)* 8 (2) (May): 77-81.
- Bröer, A, CA Wagner, F Lang, and S Bröer. 2000. "The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y⁺LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine." *Biochemical Journal* 349 Pt 3: 787-795.
- Böger, RH, SM Bode-Böger, A Szuba, PS Tsao, JR Chan, O Tangphao, TF Blaschke, and Cooke JP. 1998. "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia." *Circulation* 98: 1842-1847.
- Böger, RH, K Sydow, J Borlak, T Thum, H Lenzen, B Schubert, D Tsikas, and SM Bode-Böger. 2000. "LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases." *Circulation research* 87 (2) (July): 99-105.
- Busse, R, and I Fleming. 1996. "Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis." *Journal of Vascular Research* 33 (3): 181-194.
- Campa, MJ, and MS Kilberg. 1989. "Characterization of neutral and cationic amino acid transport in *Xenopus* oocytes." *Journal of cellular physiology* 141 (3) (December): 645-52.
- Cardounel, AJ, H Cui, A Samouilov, W Johnson, P Kearns, A-L Tsai, V Berka, and JL Zweier. 2007. "Evidence for the Pathophysiological Role of Endogenous

- Methylarginines in Regulation of Endothelial NO Production and Vascular Function." *The Journal of biological chemistry* 282 (2) (January): 879-87.
- Celermajer, DS, KE Sorensen, VM Gooch, B Miller, ID Sullivan, JK Lloyd, JE Deanfield, and DJ Spiegelhalter. 1992. "Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis." *The Lancet* 340 (8828) (November): 1111-1115.
- Chairoungdua, A, H Segawa, JY Kim, K-I Miyamoto, H Haga, Y Fukui, K Mizoguchi, H Ito, E Takeda, H Endou, and Y Kanai. 1999. "Identification of an Amino Acid Transporter Associated with the Cystinuria-related Type II Membrane Glycoprotein." *Journal of Biological Chemistry* 274 (41) (October 8): 28845-28848.
- Cherry, PD, RF Furchgott, JV Zawadzki, and D Jothianandan. 1982. "Role of Endothelial Cells in Relaxation of Isolated Arteries by Bradykinin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (6) (March 15): 2106-2110.
- Christensen, HN. 2010. "A Transport System Serving for Mono- and Diamino Acids." *Sciences-New York* 51 (2): 337-344.
- Christensen, HN, and JA Antonioli. 1969. "Cationic Amino Acid Transport in the Rabbit Reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport." *Journal of Biological Chemistry* 244 (6): 1497-504.
- Closs, EI, P Gräf, A Habermeier, JM Cunningham, and U Förstermann. 1997. "Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: Three related carriers with distinct transport properties." *Biochemistry* 36 (21): 6462-6468.
- Closs, EI, and GE Mann. 1999. "Identification of carrier systems in plasma membranes of mammalian cells involved in transport of L-arginine." *Methods in Emzymology* 301:78-91.
- Corrado, E, P Camarda, G Coppola, I Muratori, G Ciaramitaro, M Farinella, G Novo, A Rotolo, G Andolina, V Cospite, S Evola, P Assennato, E Hoffmann, and S Novo. 2009. "Prognostic role of endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness in patients undergoing coronary stent implantation." *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 28 (1) (February): 12-9.
- Crabtree, MJ, AL Tatham, Y Al-Wakeel, N Warrick, AB Hale, S Cai, KM Channon, and NJ Alp. 2009. "Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression." *The Journal of biological chemistry* 284 (2) (January 9): 1136-44.
- Davignon, J, and P Ganz. 2004. "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." *Circulation* 109 (23 Suppl 1) (June 15): III27-32.

- Devés, R, P Chavez, and CA Boyd. 1992. "Identification of a new transport system (y^+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity." *The Journal of Physiology* 454: 491-501.
- Dudzinski, DM, J Igarashi, D Greif, and T Michel. 2006. "The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase." *Annual review of pharmacology and toxicology* 46 (January): 235-76.
- Dumont, J. 1972. "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin), 1. stages of oocyte development in laboratory maintained animals", 155, 73-98.
- Durante, W, FK Johnson, and RA Johnson. 2007. "Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 34 (9): 906-11.
- Dye, JF, S Vause, T Johnston, P Clark, JA Firth, SW D'Souza, CP Sibley, and JD Glazier. 2004. "Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvasclar endothelial cells." *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (1) p. 125-7.
- Edgell, C, C McDonald, and J Graham. 1983. "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3734-3737. National Acad Sciences.
- Ferrara, N. 2001. "Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280 (6): C1358-1366.
- Frick, M, T Neunteufl, SP Schwarzacher, TC Wascher, and F Weidinger. 2002. "Fluß-vermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert." *Austrian Journal of Cardiology* 9 (10): 439-444.
- Fronek, A, and M Allison. 2008. "Non-invasive assessment of endothelial activity in patients with coronary heart disease and cardiovascular risk factors." *VASA. Zeitschrift für Gefässkrankheiten. Journal for vascular diseases* 37 (2) (May): 137-42.
- Furchgott, RF, and JV Zawadzki. 1980. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 288 (5789) (November 27): 373-6.
- Furesz, TC, AJ Moe, and CH Smith. 1991. "Two cationic amino acid transport systems in human placental basal plasma membranes." *American Journal of Physiology* 261 (2):C246-C252.
- Förstermann, U. 2006. "Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal." *Biological Chemistry* 387 (12): 1521–1533.

- Förstermann, U, El Closs, JS Pollock, M Nakane, P Schwarz, I Gath, and H Kleinert. 1994. "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." *Hypertension* 23 (6): 1121-1131.
- Förstermann, U, H Kleinert, I Gath, P Schwarz, El Closs, and NJ Dun. 1995. "Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types." In *Nitric Oxide - Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications*, ed. L Ignarro and F Murad, 171-186. San Diego: Academic Press. ISBN: 978-0-12-0329359.
- Gallacher, DV, and AP Morris. 1987. "The receptor-regulated calcium influx in mouse submandibular acinar cells is sodium dependent: a patch-clamp study." *The Journal of Physiology* 384: 119-130.
- Ganapathy, V, ME Ganapathy, and FH Leibach. 2000. "Intestinal transport of peptides and amino acids." *Gastrointestinal transport molecular physiology*. Vol. 50. Elsevier. ISBN: 978-0-12-153350-2.
- Ghio, D, F Bussolino, G Garbarino, R Heller, F Turrini, G Pescarmona, EJ Cragoe, L Pegoraro, and A Bosia. 1988. "Role of Na⁺/H⁺ exchange in thrombin-induced platelet-activating factor production by human endothelial cells." *Journal of Biological Chemistry* 263 (36): 19437-19446.
- Gorenflo, M, C Zheng, E Werle, W Fiehn, and HE Ulmer. 2001. "Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 37 (4): 489-92.
- Hasselgren, PO, and JE Fischer. 1997. "The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions." *Annals of Surgery* 225 (3): 307-316.
- Hattori, Y, N Nakanishi, K Akimoto, M Yoshida, and K Kasai. 2003. "HMG-CoA Reductase Inhibitor Increases GTP Cyclohydrolase I mRNA and Tetrahydrobiopterin in Vascular Endothelial Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (2) (January 2): 176-182.
- Hay, R, C Williams, M Macy, and K Lavappa. (1982). "Cultured cell lines for research on pulmonary physiology available through the American type culture collection." *The American review of respiratory disease* 125 (2): 222-32.
- Heinzel, B, M John, P Klatt, E Böhme, and B Mayer. 1992. "Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase." *The Biochemical journal* 281 (Pt 3 (February 1): 627-30.
- Holowatz, LA, CS Thompson, and WL Kenney. 2006. "L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilation in aged human skin." *The Journal of Physiology* 574 (2): 573-581.

- Hosokawa, H, T Sawamura, S Kobayashi, H Ninomiya, S Miwa, and T Masaki. 1997. "Cloning and Characterization of a Brain-specific Cationic Amino Acid Transporter." *Journal of Biological Chemistry* 272 (13) (March 28): 8717-8722.
- Ignarro, LJ, GM Buga, KS Wood, RE Byrns, and G Chaudhuri. 1987. "Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein is Nitric Oxide." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (24) (December 15): 9265-9269.
- Ishii, K, H Sheng, T Warner, U Förstermann, and F Murad. 1991. "A simple and sensitive bioassay method for detection of EDRF with RFL-6 rat lung fibroblasts." *The American journal of physiology*, 261 (2 Pt 2), H598-603.
- Ito, A, PS Tsao, S Adimoolam, M Kimoto, T Ogawa, and JP Cooke. 1999. "Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase." *Circulation* 99 (24): 3092-3095.
- Ito, K. 1997. "A New Member of the Cationic Amino Acid Transporter Family Is Preferentially Expressed in Adult Mouse Brain." *Journal of Biological Chemistry* 272 (42) (October 17): 26780-26786.
- Kanai, Y, Y Fukasawa, SH Cha, H Segawa, A Chairoungdua, DK Kim, H Matsuo, JY Kim, K Miyamoto, E Takeda, and H Endou. 2000. "Transport properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition." *Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20787-20793.
- Kanno, T, A Saito, and Y Sato. 1977. "Stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar cells: influences of external sodium and calcium on responses to cholecystokinin-pancreozymin and ionophore A23187." *The Journal of Physiology* 207 (1): 9-28.
- Kekuda, R, V Torres-Zamorano, YJ Fei, PD Prasad, HW Li, LD Mader, FH Leibach, and V Ganapathy. 1997. "Molecular and functional characterization of intestinal Na⁺-dependent neutral amino acid transporter B^{0,+}." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 272 (6): G1463-1472.
- Kielstein, JT, SM Bode-Böger, JC Frölich, E Ritz, H Haller, and D Fliser. 2003. "Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects." *Circulation* 107 (14) (April 15): 1891-5.
- MacAllister, RJ, H Parry, M Kimoto, T Ogawa, RJ Russell, H Hodson, GSJ Whitley, and P Vallance. 1996. "Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase." *British Journal of Pharmacology* 119 (8): 1533-1540.
- Miyazaki, H, H Matsuoka, JP Cooke, M Usui, S Ueda, S Okuda, and T Imaizumi. 1999. "Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor: A Novel Marker of Atherosclerosis." *Circulation* 99: 1141-1146.
- Nagase, T, N Seki, K Ishikawa, M Ohira, Y Kawarabayasi, O Ohara, A Tanaka, H Kontani, N Miyajima, and N Nomura. 1996. "Prediction of the Coding Sequences

- of Unidentified Human Genes. VI. The Coding Sequences of 80 New Genes (KIAA0201-KIAA0280) Deduced by Analysis of cDNA Clones from Cell Line KG-1 and Brain." *DNA Research* 3 (5) (January 1): 321-329.
- Ogawa, T, M Kimoto, and K Sasaoka. 1989. "Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney." *Journal of Biological Chemistry* 264 (17): 10205-10209.
- Osanai, T, M Saitoh, S Sasaki, H Tomita, T Matsunaga, and K Okumura. 2003. "Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells." *Hypertension* 42 (5): 985-990.
- Palacín, M, R Estévez, J Bertran, and A Zorzano. 1998. "Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters." *Physiological Reviews* 78 (4): 969-1054.
- Palmer, RM, DD Rees, DS Ashton, and S Moncada. 1988. "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 153 (3): 1251-1256.
- Pettersson, A, T Hedner, and I Milsom. 1998. "Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 77 (8): 808-813.
- Pfeiffer, R, G Rossier, B Spindler, C Meier, L Kühn, and F Verrey. 1999. "Amino acid transport of γ^+ L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family." *The Embo Journal* 18 (1): 49-57.
- Prinzmetal, M, A Ekmekci, H Toyoshima, and J K Kwoczyński. 1959. "Angina pectoris. III. Demonstration of a chemical origin of ST deviation in classic angina pectoris, its variant form, early myocardial infarction, and some noncardiac conditions." *The American journal of cardiology* 3 (3) (March): 276-93.
- Radomski, MW, RMJ Palmer, and S Moncada. 1987. "Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium." *The Lancet* 330 (8567) (November): 1057-1058.
- Reed, PW. 1982. "Biochemical and Biological Effects of Carboxylic Acid Ionophores." In: Polyether Antibiotics: Naturally Occurring Acid Ionophores. Vol. 1 (JW Westley, ed.). Marcel Dekker. New York, pp. 185-302.
- Rees, DD, RM Palmer, R Schulz, HF Hodson, and S Moncada. 1990. "Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo." *British Journal of Pharmacology* 101 (3) (November): 746-52.
- Rizzo, V, DP McIntosh, P Oh, and JE Schnitzer. 1998. "In Situ Flow Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase in Luminal Caveolae of Endothelium with

- Rapid Caveolin Dissociation and Calmodulin Association." *Journal of Biological Chemistry* 273 (52) (December 25): 34724-34729.
- Rotmann, A, A Simon, U Martiné, A Habermeier, and EI Closs. 2007. "Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y^+ and y^+L ." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292 (6) (June): C2259-68.
- Sala, R, BM Rotoli, E Colla, R Visigalli, A Parolari, O Bussolati, GC Gazzola, and C Dall'Asta. 2001. CTwo-way arginine transport in human endothelial cells: TNF- α stimulation is restricted to system y^+ ." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282 (1) p. C134-143
- Sandmann, J. 2000. VUntersuchungen zur Bedeutung der S-Transnitrosylierungs-Reaktion für die Bildung, den Metabolismus und die Vermittlung der biologischen Aktivitäten von NO und S-Nitroso-Substanzen." *University of Hannover*. Hannover.
- Schulze, F, H Lenzen, C Hanefeld, A Bartling, KJ Osterziel, L Goudeva, C Schmidt-Lucke, M Kusus, R Maas, E Schwedhelm, D Strödter, BC Simon, A Mügge, WG Daniel, H Tillmanns, B Maisch, T Streichert, and RH Böger. 2006. "Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study." *American heart journal* 152 (3) (September): 493.e1-8.
- Siani, A, E, Pagano, R Iacone, L Iacoviello, F Scopacasa, and P Strazzullo. 2000. "Blood pressure and metabolic changes during dietary L-arginine supplementation in humans." *American Journal of Hypertension* 13 (5): 547-551.
- Stuehr, DJ, HJ Cho, NS Kwon, MF Weise, and CF Nathan. 1991. "Purification and Characterization of the Cytokine-Induced Macrophage Nitric Oxide Synthase: An FAD- and FMN-Containing Flavoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (17) (September 1): 7773-7777.
- Taylor, PM, S Kaur, B Mackenzie, and GJ Peter. 1996. "Amino-acid-dependent modulation of amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes." *The Journal of Experimental Biology* 199 (4) (April 1): 923-931.
- Teubl, M. 1999. " Na^+/Ca^{2+} Exchange Facilitates Ca^{2+} -dependent Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase." *Journal of Biological Chemistry* 274 (41) (October 8): 29529-29535.
- Torrents, D, R Estévez, M Pineda, E Fernández, J Lloberas, Y-B Shi, A Zorzano, and M Palacín. 1998. "Identification and characterization of a membrane protein (y^+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y^+L - A candidate gene for lysinuric protein intolerance." *Journal of Biological Chemistry* 273 (49): 32437-32445.
- Tran, CT, MF Fox, P Vallance, and JM Leiper. 2000. "Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins." *Genomics* 68 (1) (August): 101-5.

- Verrey, F, El Closs, CA Wagner, M Palacin, H Endou, and Y Kanai. 2004. "CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters." *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 447 (5) (March): 532-42.
- Wever, RM, T van Dam, H van Rijn, F de Groot, and TJ Rabelink. 1997. "Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase." *Biochemical and biophysical research communications* 237 (2) (August 18): 340-4.
- Van Winkle, LJ, AL Campione, and JM Gorman. 1988. "Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates." *The Journal of Biological Chemistry* 263: 3150-3163.
- Van Winkle, LJ, HN Christensen, and AL Campione. 1985. "Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts." *The Journal of Biological Chemistry* 260: 12118-12123.
- Van Winkle, LJ, and AL Campione. 1987. "Development of amino acid transport system B^{0,+} in mouse blastocysts." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 925 (2): 164-174.
- Xia, Y, A-L Tsai, V Berka, and JL Zweier. 1998. "Superoxide Generation from Endothelial Nitric-oxide Synthase. A Ca²⁺/Calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process." *Journal of Biological Chemistry* 273 (40): 25804-25808.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.