

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**DİMETİLARGİNİN DİMETİLAMİNOHİDROLAZ (DDAH)
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

(Doktora Programı)

Emel ÇAĞLAR YILDIZ
Uzm. Biyolog

ANKARA
2009

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**DİMETİLARGİNİN DİMETİLAMİNOHİDROLAZ (DDAH)
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Emel ÇAĞLAR YILDIZ
Uzm. Biyolog

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'nün
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı
İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
M. Kemal ERBİL
Prof. Dr. Ecz. Kd. Alb.

**ANKARA
2009**

GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

“Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Saflaştırılması Ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. M. Kemal ERBİL

Üye : Prof.Dz.Tbp.Kd.Alb.Ahmet C. BAŞUSTAOĞLU

Üye : Prof.Dr. Bolkan ŞİMŞEK (Gazi Üniv.)

Üye : Prof.Dr. Serpil NEBİOĞLU (Ankara Üniv.)

Üye : Doç.Dz.Tbp.Kd.Bnb. Halil YAMAN

ONAY:

Uzm. Bio. Emel ÇAĞLAR YILDIZ (G-9573)' ın 0/06/2009 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M. Tahir ÜNAL
Prof.Tbp.Tuğgeneral
Sağ. Bil. Enst. Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora olanağı sağlayarak eğitimime katkı sağlayan, ayrıca tez danışmanlığı yapıp benden yardımlarını hiç eksik etmeyen, beni yönlendiren ve destek olan değerli hocam Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. M.Kemal ERBİL'e,

Doktora eğitimime katkılarından dolayı diğer hocalarım Prof.Ecz.Kd.Alb. Şerif AKMAN'a, Prof.Ecz.Kd.Alb. İsmail KURT'a, Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. Cumhuriyet BİLGİ'ye, Doç.Tbp.Alb. Taner ÖZGÜRTAŞ'a, Doç.Dz.Tbp.Alb. Muhittin A. SERDAR'a, Doç.Dz.Tbp.Yb. Erdinç ÇAKIR'a, Doç.Dz.Tbp.Kd.Bnb. Halil YAMAN'a, Doç.Dz.Tbp.Bnb. E.Özgür AKGÜL'e ve Yrd.Doç.J.Tbp.Bnb. Serkan TAPAN'a, Yrd.Doç.Tbp.Yzb.Tuncer ÇAYCI'ya,

Çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Tbp.Kd.Alb. Adnan HAŞİMİ'ye ve tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanları ve arkadaşlarıma,

Bu tez çalışmasını 2007/45 no'lu proje ile destekleyen Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Projeleri birimine,

Doktora eğitimimin her döneminde yanımda olan sevgili eşim Nihat YILDIZ'a ve biricik oğlum Çağlar'a, tüm yaşamım ve eğitimim boyunca benim için her türlü fedakarlığı gösteren anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Biyolog Emel ÇAĞLAR YILDIZ
ANKARA-2009

ÖZET

Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Saflaştırılması Ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Böbrekte çok miktarda bulunan Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz enzimi (DDAH; E.C.3.5.3.18), Asimetrik dimetilargininin (ADMA)'in, L-sitrülin ve dimetilamine metabolizmasını katalizleyen bir enzimdir.

Bu tez çalışmasında NO metabolizmasında düzenleyici bir enzim olan DDAH enzim aktivitesinin ölçümü için uygulanabilir, hassas ve güvenilir bir spektrofotometrik yöntem optimize edilmiştir. DDAH enzimi, sıçan böbreğinden elde edilmiş, amonyum sülfatla çöktürme, Sephacryl S-200, QAE-Sephadex A-50, Phenyl-Sepharose ve MMA-Sepharose kromatografisi kullanılarak %28 verim ve 260.03×10^{-3} U/mg protein'lik spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır. Enzimin saflık kontrolü sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile yapılmıştır. DDAH enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 33560 dalton, Sephacryl S-200 jel filtrasyonu ile 35870 dalton olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH'sı 6.5 olarak saptanmıştır. DDAH enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın (0-80°C) etkisi incelenmiş, enzim aktivitesinin 40°C'ye kadar zamanla arttığı gözlenmiştir. Sıçan böbreği DDAH enziminin optimum sıcaklığı 37°C olarak bulunmuştur. Arrhenius eğrisinden, enzimin aktivasyon enerjisi (E_a) 38,845 kJ/mol, aktivasyon entalpisi (ΔH) 38,703 kJ/mol ve sıcaklıkla aktivite artma faktörü Q_{10} ise 1.63 olarak hesaplanmıştır. Enzimin kinetik analizi yapılmış, ADMA için K_m değeri 0.21 mM, DDAH'ın maksimum hızı (V_{max}) 0.48 U/mg protein olarak bulunmuştur. Hill grafiklemesinden yararlanılarak enzimin ADMA için Hill sabiti (h) 0.74 olarak bulunmuş ve enzimin substratı ile negatif kooperativite gösterdiği saptanmıştır. Sıçan böbreği DDAH enziminin k_{cat} ve V_0 değerleri sırayla 0.165 s^{-1} ve $786 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} gibi çift değerlikli metal iyonlarının enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu çalışma literatürlere göre Türkiye' de DDAH enziminin saflaştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

NO-ADMA-Homosistein metabolizmalarının regülasyonunda kilit enzimlerden biri olan DDAH enziminin karakteristik özelliklerinin bilinmesinin özellikle kardiyovasküler, serebrovasküler, renal ve pulmoner hastalıkların tedavisinde yeni görüş ve yaklaşımların olgunlaşmasında ve yeni ilaçların bulunmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : DDAH, ADMA, sıçan böbreği, saflaştırma
Destekleyen Kurumlar : Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Yazar Adı : Uzm.Bio. Emel ÇAĞLAR YILDIZ
Danışman : Prof.Dr.Kd.Alb. M. Kemal ERBİL

ABSTRACT

Purification and Investigation of Kinetic Properties of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Enzyme (DDAH)

Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH; E.C. 3.5.3.18) enzyme which catalyzes asymmetric dimethylarginine (ADMA) thereby forming L-citrulline and dimethylamine presents in large quantities in the kidney.

In this project, a pre-existing sensitive spectrophotometric method has been optimized for the measurement of activity of DDAH enzyme that is regulatory enzyme in nitric oxide (NO) metabolism. Rat kidney derived DDAH enzyme purification has been accomplished by using Sephacryl S-200, QAE-Sephadex A-50, Phenyl-Sepharose, MMA-Sepharose chromatographies following ammonium sulfate precipitation, with 28% yield and determined to have a specific activity of 260.03×10^{-3} units per milligram protein. Purity was controlled by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular weight of DDAH was found to be 33560 daltons by SDS-PAGE and 35870 daltons by Sephacryl S-200 gel filtration. The optimum pH of the enzyme was 6.5. Effect of temperature on DDAH stability was investigated between 0-80 °C. Rat kidney DDAH enzyme activity was shown to increase up to 40 °C and the optimum temperature for the enzyme was 37 °C. From Arrhenius plot, E_a , ΔH and Q_{10} were found to be 38,845 kJ/mole, 38,703 kJ/mole and 1.63, respectively. As the kinetic parameters, K_m value for ADMA was 0.21 mM and V_{max} value for DDAH was 0.48 U/mg protein. The Hill constant for ADMA was 0.74 ($h < 1.00$) and the enzyme showed negative cooperativity with its own substrate. k_{cat} and V_0 values of the rat kidney DDAH were found as 0.165 s^{-1} and $786 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The activity was shown to be inhibited by some divalent metal ions (e.g. Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}). According to literature, this is the first study covering DDAH enzyme purification in Turkey.

Characterization of DDAH enzyme which was shown to have key role in regulation of NO-ADMA-Homocysteine metabolism may provide new insights into management of cardiovascular, cerebrovascular, renal and pulmonary disorders; moreover, this approach may pose novel treatment models for these pathologies.

Key words : DDAH, ADMA, rat kidney, purification
Supported by : Gülhane Military Medical Academy
Author : Emel ÇAĞLAR YILDIZ, Uzm.Bio
Counsellor : M. Kemal ERBİL, Prof.Dr.Kd.Alb.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Nitrik Oksit (NO).....	4
2.2. NOS' un ADMA ve NMMA Tarafından Regülasyonu.....	5
2.3. ADMA ve NMMA Regülasyonu.....	10
2.4. Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enzimi.....	10
2.5. DDAH Genleri ve Proteinleri.....	12
2.5.1. Gen ve Protein Ekspresyon Çalışmaları.....	12
2.5.2. DDAH Genlerinin Kromozomal Yerleşimi.....	14
2.5.3. DDAH Gen ve Proteinlerinin Yapısı.....	14
2.5.4. DDAH Genlerindeki Tek Nükleotid Polimorfizmler.....	16
2.6. DDAH Aktivitesi veya ADMA Tarafından Gen Ekspresyonunun Regülasyonu.....	16
2.7. DDAH Eksprese Eden Bölgeler ve İşlevleri.....	18
2.7.1. DDAH Organ Dağılımları.....	18
2.7.2. Kan Damarlarında DDAH Ekspresyonu ve İşlevleri.....	19
2.7.3. Böbreklerde DDAH Ekspresyonu ve İşlevleri.....	20
2.8. Hastalıklarda DDAH Ekspresyonu.....	20
2.8.1. Hipertansiyon ve ADMA.....	22
2.8.2. Gebelik Ve Preeklampsi.....	24
2.8.3. Kardiovasküler Hastalıklar ve Ateroskleroz.....	25
2.8.4. Kronik Böbrek Yetmezliği.....	26

2.8.5.	Karaciğer Yetmezliği.....	27
2.8.6.	Diabetes Mellitus ve İnsülin Rezistansı.....	27
2.9.	DDAH Aktivitesi.....	30
2.9.1.	DDAH Aktivite Ölçümleri.....	30
2.9.2.	Nitrozilasyon.....	31
2.9.3.	Tiyol Oksidasyonu.....	32
2.9.4.	Arjinin ve Sitrülinin Etkileri.....	33
	GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1.	Kullanılan Örnekler.....	35
3.2.	Gerekli Cihaz ve Kimyasal Maddeler.....	35
3.2.1.	Cihazlar.....	35
3.2.2.	Kimyasal Maddeler.....	36
3.3.	Yöntemler.....	37
3.3.1.	Çözeltilerin Hazırlanması.....	37
3.3.1.1.	Enzim Saflaştırmada Kullanılan Çözeltiler.....	37
3.3.1.2.	Enzim Aktivite tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	38
3.3.1.3.	Enzimin Kinetik Özellikleri ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	39
3.3.1.4.	Protein Miktarının Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	39
3.3.1.5.	Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS - PAGE) İçin Kullanılan Çözeltiler.....	40
3.3.1.6.	Jel Filtrasyon Kromatografisi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	41
3.3.1.7.	Örneklerin Sağlanması.....	41
3.3.2.	Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Kantitatif Ölçümü.....	41
3.3.3.1.	Standart Eğri Çizimi.....	41
3.3.3.2.	DDAH Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemini Geliştirmek İçin Yapılan Ön Analitik Çalışmalar.....	42
3.3.3.3.	Saflaştırılan Dokunun Başlangıç DDAH Aktivitesi Ölçümü....	43
3.3.4.	Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Böbrek Dokusundan Saflaştırılması.....	44
3.3.4.1.	Homojenizasyon.....	44

3.3.4.2.	Amonyum Sülfatla Çöktürme.....	44
3.3.4.3.	Jel Filtrasyonu (Sephacryl S-200 Kromatografi).....	45
3.3.4.4.	İyon Değişirici Kromatografi (QAE-Sephadex Kromatografi).....	45
3.3.4.5.	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Phenyl-Sepharose Kromatografi).....	46
3.3.4.6.	Affinite Kromatografisi (NG, NG- monometilarginin (MMA)- Sepharose Kromatografi).....	46
3.3.5.	Protein Miktarının Saptanması.....	47
3.3.5.1.	Kalitatif Protein Miktarı Tayini.....	47
3.3.5.2.	Kantitatif Protein Miktarı Tayini.....	47
3.3.5.3.	Jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi.....	47
3.3.5.4.	SDS-PAGE Elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının hesaplanması.....	49
3.3.6.	DDAH Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi.....	50
3.3.6.1.	DDAH' nin Optimum pH' sı.....	50
3.3.6.2.	DDAH' nin Optimum Sıcaklığının, Aktivasyon Enerjisinin(E_a), Aktivasyon Entalpisinin (ΔH) ve her 10 °C' deki sıcaklıkla artma faktörünün (Q_{10}) Hesaplanması.....	50
3.3.6.3.	DDAH' nin Substrat Kinetiği.....	51
3.3.6.4.	Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi.....	51
3.3.6.5.	Enzimin Depolama Kararlılığı.....	51
3.3.7.	Enzimin Aminoasit Analizi.....	52
3.3.8.	İstatistiksel Değerlendirme.....	52
	BULGULAR.....	53
4.1.	Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Kantitatif Ölçümü.....	53
4.1.1.	DDAH Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemini Geliştirmek İçin Yapılan Analitik Ön Çalışmalar.....	53
4.1.2.	Saflaştırılan Dokunun Başlangıç DDAH Aktivitesi Ölçümü....	56
4.1.2.1.	Standart Sitrülin Eğrisinin Çizimi (DDAH Aktivite Ölçümü)....	56

4.1.2.2.	Standart Protein Eğrisinin Çizimi.....	57
4.2.	Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Böbrek Dokusundan Saflaştırılması.....	58
4.2.1.	Saflaştırma Basamakları.....	58
4.2.2.	Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....	64
4.2.3.	SDS-PAGE Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması.....	65
4.3.	DDAH Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi.....	67
4.3.1.	Optimum pH' nın Saptanması.....	67
4.3.2.	DDAH' ın Optimum Sıcaklığının Saptanması.....	68
4.3.3.	DDAH' ın Aktivasyon Enerjisinin (E_a), Aktivasyon Entalpisinin (ΔH) ve Her 10 °C' deki Sıcaklıkla Aktivite Artma Faktörünün (Q_{10}) Hesaplanması.....	69
4.3.4.	DDAH' ın Michaelis-Menten Katsayısı (K_m), Maksimum Hızı (V_{max}), Turnover Sayısı (K_{cat}) Ve Özgüllük Sabiti (V_0) Değerlerinin Belirlenmesi.....	69
4.3.5.	DDAH Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	72
4.3.6.	Depolama Kararlılığının Araştırılması.....	72
4.3.7.	DDAH Enziminin Aminoasit Analizi Sonuçları.....	73
	TARTIŞMA.....	74
	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
	KAYNAKLAR.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

ΔH	: Aktivasyon entalpisi
ACEI	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri
ADMA	: Asimetrik Dimetil Arjinin
Anj II	: Anjiyotensin II
ARB	: Anjiyotensin reseptör bloke edici ajanlar
AT ₁ -R	: Anjiyotensin 1 Reseptörü
bFGF	: Fibroblast growth factor
BH4	: Tetrahidrobiopterin
BMP	: Bone morphogenetic protein
BMP2K	: Bone morphogenetic protein 2 inducible kinase
BMPR1A	: Bone morphogenetic protein receptor 1A
BP	: Kan Basıncı
Ca ⁺²	: Kalsiyum iyonu
CF6	: Coupling Faktör 6
DCT	: Distal Kıvrımlı Tübül
DDAH	: Dimetilarginin DimetilAminoHidrolaz
DM	: Diabetes Mellitus
E _a	: Aktivasyon enerjisi
EDRF	: Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
HELLP	: Hemolysis Elevated Liver Enzymes and Low Platelets
IL-1 β	: İnterlökin 1-beta
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KAT	: Katyonik Aminoasit Taşıyıcıları
k _{cat}	: Turnover sayısı
K _m	: Michaelis sabiti
LPS	: Lipopolisakkarit
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NF 1	: Neurofibromin 1
NF- κ B	: Nükleer Faktör-Kappa B

NMMA	: Monometil Arjinin
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
ORF	: Open Reading Frame
PAD	: Protein Arjinin Deiminaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIO	: Pioglitazon
PKA	: Protein Kinaz A
PRMT	: Protein Arjinin Metil Transferaz
PT	: Proksimal Tübül
Q10	: Sıcaklıkla aktivite artma faktörü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RVR	: Renal Vasküler Direnç
SDMA	: Simetrik Dimetil Arjinin
siRNA	: Small Interference RNA
Smad-5	: Smooth muscle action-related protein 5
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSCP	: Single Strand Conformation Polymorphism
TAL	: Henle kulpunun yukarı doğru çıkan kalın kolu
TGF- β	: Transforming Growth Factor – Beta
TNF- α	: Tümör Nekrozis Alfa
V_0	: Özgüllük sabiti
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
V_{max}	: Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
3.1.	Nitrik oksit sentezi ve hedef hücredeki etkileri	4
3.2.	İnsan vücudunda ADMA biyosentezi ve metabolizması	5
3.3.	Proteinlerdeki arjinin kalıntılarının protein metil transferazlar ile metilasyonu	6
3.4.	Arjinin, NMMA, ADMA ve SDMA'nın moleküler formülleri	7
3.5.	Metillenmiş arjinin türevlerinin oluşumu ve metabolizması	8
3.6.	DDAH aktivitesini artıran ve azaltan faktörler	13
3.7.	İnsan DDAH-1 ve DDAH-2 geni	14
3.8.	Kardiyovasküler ve renal hastalıklarda ADMA' nın regülasyonu ve diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkisi	21
3.9.	Anjiyotensin II ve NADPH oksidazlar ile oluşan süperoksit anyonunun DDAH enzimi dolayısıyla ADMA-NO metabolizması üzerindeki etkileri	24
3.10.	DDAH aktivitesindeki değişimler sonucu oluşan ADMA birikimi ve patofizyolojik etkileri	26
3.11.	Diabetes Mellitus'ta DDAH enzimine bağımlı regülasyon	29
3.12.	Fizyolojik koşullarda eNOS enzim aktivitesi	33
3.13.	ADMA' nın eNOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	34
3.14.	L-Arjinin desteği sonrası eNOS enzim aktivitesindeki değişimler	34
4.1.	Üreaz konsantrasyonunun ortamdaki üre ve sitrüllin konsantrasyonu üzerine etkisi	54
4.2.	Sitrüllin standart kalibrasyon eğrisi	57
4.3.	Protein standart kalibrasyon eğrisi	57
4.4.	Amonyum sülfat ilavesinden sonra süpernatanda çökmeden kalan enzimin aktivitesi	58
4.5.	Sephacryl S-200 kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm dalga boyundaki absorbanslarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği	59

4.6.	QAE-Sephadex A-50 kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm' deki absorbanlarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği	60
4.7.	Phenyl-Sepharose CL-4B kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm' deki absorbanlarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği	61
4.8.	MMA-Sepharose kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm' deki absorbanlarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği	62
4.9.	DDAH enziminin molekül ağırlığını belirlemek için yapılan jel filtrasyonu sonucu elde edilen standart grafik	64
4.10.	DDAH enzimine ait SDS-PAGE elektroforez sonuçları	65
4.11.	SDS-PAGE jel elektroforezinde standart olarak kullanılan sığır serum albumini, ovalbumin, karbonik anhidraz ve sitokrom c'nin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı göç hızları (Rf)	66
4.12.	DDAH enzimi için optimum pH grafiği	67
4.13.	DDAH enzimi için optimum sıcaklık grafiği	68
4.14.	DDAH enzimi için Arrhenius grafiği	69
4.15.	DDAH enzimi için Michaelis-Menten grafiği	70
4.16.	DDAH enzimi için Lineweaver-Burk grafiği	70
4.17.	DDAH enziminin ADMA substratı için Hill grafiklemesi	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
4.1.	Deproteinizasyon sonucu alınan absorbans değerleri	54
4.2.	Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	55
4.3.	Sitrüllin ölçümü için geri elde sonuçları	56
4.4.	DDAH enziminin saflaştırma basamakları	63
4.5.	Standart proteinlerin ve DDAH enziminin molekül ağırlıkları ve K_{av} değerleri	65
4.6.	Standart proteinlerin ve DDAH enziminin göç hızları ve moleküler ağırlıkları	66
4.7.	DDAH enziminin farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri	67
4.8.	DDAH enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivite değerleri	68
4.9.	DDAH enzimi için farklı substrat konsantrasyonlarında ölçülen aktivite değerleri	70
4.10.	DDAH enziminin kinetik sabitleri	71
4.11.	Bazı metal iyonlarının DDAH enzim aktivitesi üzerine etkisi	72
4.12.	DDAH enziminin depolama kararlılığı ile ilgili bulgular	72
4.13.	DDAH enziminin aminoasit kompozisyonu	73
4.14.	Sıçan böbreği DDAH enzimi için yapılan çalışmaların sonuçları	83

GİRİŞ VE AMAÇ

Birçok biyolojik olayda önemli rol oynayan ve oldukça kısa yarı ömürlü bir serbest radikal olarak nitelendirilen nitrik oksit (NO) molekülü, önceleri vasküler sistemde, endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak tanımlanmıştır. NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin, arjininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS'un genetik olarak farklı üç izoenzimi tespit edilmiştir. Bunlar düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan endotel izoenzimi (eNOS), yine az miktarda üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen nöronal izoenzimi (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuvar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir bileşen olan indüklenebilir izoenzimi (iNOS) dir. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için kalsiyum (Ca^{+2})– kalmodulin kompleksine bağımlı, iNOS ise bu kompleksten bağımsız işlev görür (94).

Normal fizyolojik konsantrasyonlarda, hemen hemen tüm organ sistemlerinde çeşitli biyolojik etkilere sahip olan NO, gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve kavernoöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli bir madde olması yanında, merkezi sinir sisteminde hafızanın şekillenmesi gibi çeşitli işlevleri nörotransmitter olarak destekler. Periferde ise gastrointestinal, solunum ve genitoüriner sistemle ilgili çeşitli fonksiyonları düzenler. NO' nun, konak savunması ve immunolojik reaksiyonlarda da fonksiyonu olduğu bilinmektedir. NO sentezindeki artış miyokard işlev bozukluğu ve dolaşım yetmezliğine neden olabilir. Ayrıca NO artışı vazodilatasyona, trombosit adezyonunun engellenmesi sayesinde dokuların mikrosirkülasyonunda rahatlamaya yol açarak dokuların oksijenlenmesine katkı sağlamaktadır (94, 102).

Proteinlerin yapısında bulunan arjinin aminoasiti, metil transferazların etkisiyle metillenmiş türevlerine dönüşür. Bunlar; N-Monometil L-Arjinin (NMMA), Asimetrik Dimetil L-Arjinin (ADMA), Simetrik Dimetil L-Arjinin (SDMA) olmak üzere üç tanedir. NMMA ile ADMA, NOS enziminin geri dönüşümlü inhibisyonuna neden olur. Hemen hemen tüm memeli hücrelerinde bulunan, dolayısıyla tüm vücut sıvılarında ve birçok dokuda serbest olarak dolaşan Dimetilarginin DimetilAminoHidrolaz (DDAH) enzimi,

özellikle ADMA ve SDMA gibi metil grubu bulunduran arjinin türevlerini yıkarak sitrüllin ve metilaminleri meydana getirir (36, 89, 196).

Normal protein turnover'ı neticesinde oluşan ve NOS enzimini inhibe eden ADMA ile NMMA'nın kontrollü olarak ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan DDAH enzimi, NO radikalinin işlev gördüğü tepkimelerin sürdürülmesinde kritik önem taşır (164).

Bu tepkimeler zinciri çerçevesinde DDAH aktivitesinin inhibisyonu ADMA ve NMMA gibi metilarjininlerin birikmesine neden olur. Endojen NOS inhibitörleri olan bu aminoasit türevlerinin ortamda artması ile NO sentezi ve NO'ya bağımlı vasküler relaksasyon mekanizmaları bozularak vazokonstriksiyon meydana gelir. Bu mekanizmanın kardiyovasküler hastalıklar ile hiperkolesterolemi, diabetes mellitus ve insulin direnci gibi risk faktörleri bulunan insanlarda gözlenen "vasküler relaksasyonun bozulması"nın sorumlusu olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca okside LDL, proinflamatuvar sitokinler, hiperhomosisteinemi, hiperglisemi ve enfeksiyöz ajanlar gibi patolojik uyarıların endoteldeki oksidatif stresi indükleyerek DDAH inaktivasyonu ve dolayısıyla metil-arjinin türevi aminoasitlerinin artışına yol açmak suretiyle NOS inhibisyonuna neden olduğuna yönelik bazı bulgular mevcuttur. Aktif bölgesindeki sülfidril grubu nedeniyle DDAH enzimi oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Homosistein DDAH enzimiyle disülfid bağı oluşturabilir ve bu durumda hiperhomosisteinemi DDAH'ın inaktivasyonuna neden olur. Sonuçta homosistein ve diğer bazı kardiyovasküler risk faktörleri, DDAH'nin sülfidril grubunu oksitleyerek ADMA birikimine ve bunun sonucu olarak da NOS aktivitesinin azalmasına yol açabilmektedirler (91, 118, 172, 175).

Bu tez çalışmasında, öncelikle NO metabolizmasında oldukça önemli düzenleyici bir enzim olan DDAH enzim aktivitesinin ölçümü için kolay uygulanabilir, hassas ve güvenilir bir spektrofotometrik yöntem kurularak GATA Tıbbi Biyokimya AD.'nin rutin ölçümleri arasına girmesinin sağlanması, daha sonra DDAH enziminin saflaştırılarak ayrıntılı biçimde incelenmesi ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma çerçevesinde her bir

saflaştırma basamağındaki enzimin spesifik aktivitesi, enzimin inhibitörleri, enzimin optimum pH'sı, sıcaklığının belirlenmesi, çeşitli pH ve sıcaklıklarda enzimin aktivitesini ne derece koruyabildiğine bakılması planlanmıştır.

Bu alışma literatürlere göre Türkiye' de DDAH enziminin saflaştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

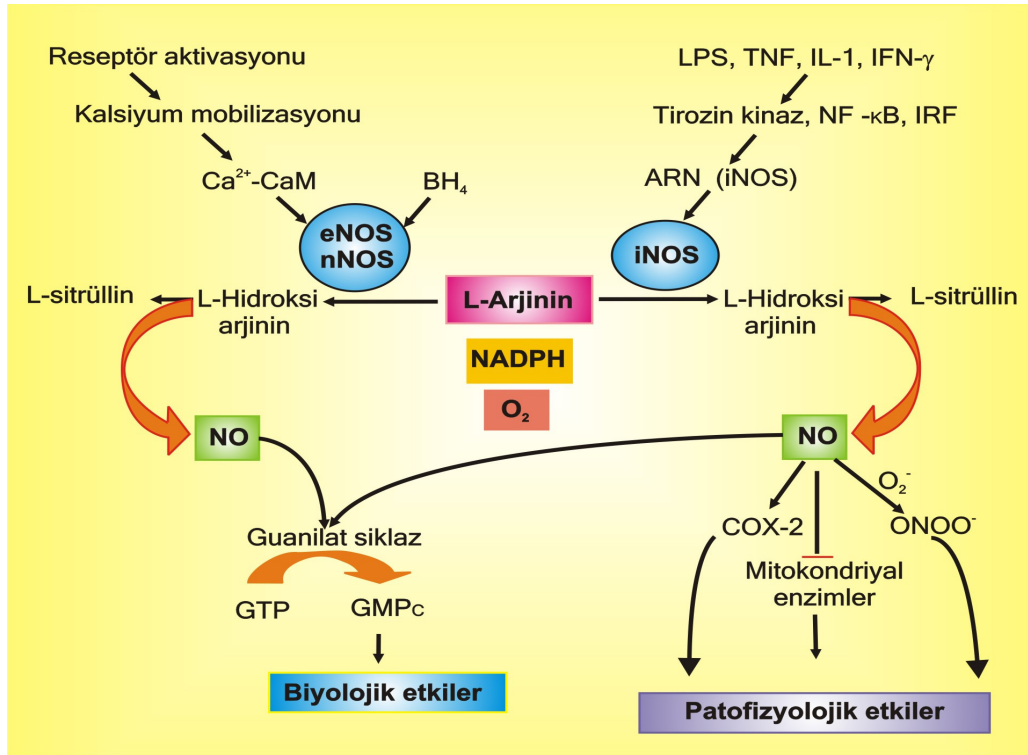
Henüz rutin kullanımda olmayan ancak çok sayıda ve farklı kurgulardaki bilimsel araştırmalara konu olan DDAH enzim aktivite ölçümünün NO-ADMA-Homosistein metabolizmalarının etkin olduğu çeşitli hastalıkların etyopatogenezinde önem taşıdığı öngörölmektedir.

Bu çerçevedeki araştırmaların özellikle kardiyovasküler, serebrovasküler, renal ve pulmoner hastalıkların tedavisinde yeni görüş ve yaklaşımların olgunlaşmasına yardımcı olması beklenmektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Nitrik Oksit (NO)

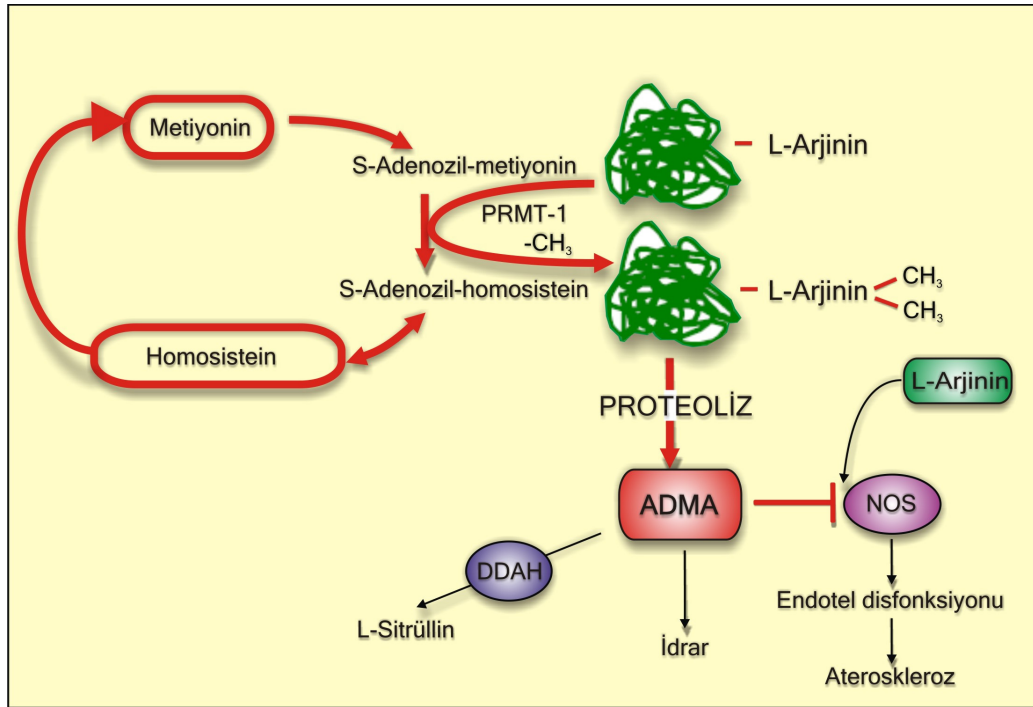
Kan basıncının, immün hücre işlevlerinin ve nöronal sinyal iletiminin düzenlenmesi gibi normal fizyolojik işlevlerde önemli bir biyomolekül olan NO, Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile arjininden üretilmektedir. Bu enzim, arjinini substrat ve tetrahidrobiopterini kofaktör olarak kullanarak nitrik oksit oluşum reaksiyonunu katalizlemektedir (86, 87, 94, 195). Memelilerde üç tane NOS izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan nöronal NOS (nNOS) nöronal sinyal iletiminde; vasküler endotelyumda bulunan endotelial NOS (eNOS) düz kasların gevşemesinde; indüklenebilir NOS (iNOS) ise makrofaj aracılı immün yanıtta yer almaktadır. Normal fizyolojik yapıda NO yer almasına karşılık, septik şok, romatoid artrit, serebral iskemik hasar, Parkinson ve Huntington hastalığı vb. gibi çeşitli bozukluklarda da NO üretiminin normalden fazla olduğu görülmektedir (Şekil.2.1) (102).



Şekil.2.1. Nitrik oksit sentezi ve hedef hücredeki etkileri

2.2. NOS' un ADMA ve NMMA Tarafından Regülasyonu

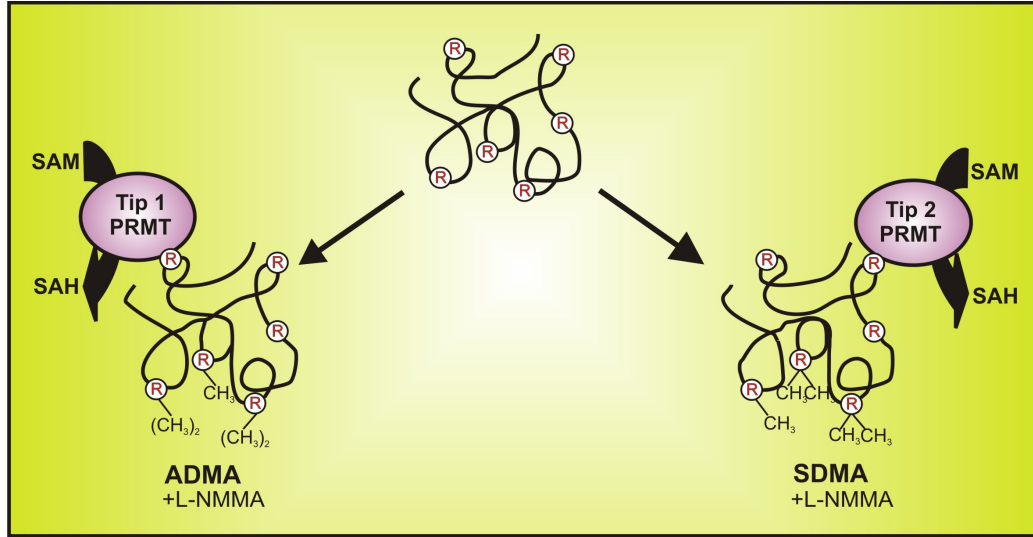
L-Arjinin aminoasitinin üç tane metillenmiş türevi vardır. Bunlar; N-Monometil L-Arjinin (NMMA), Asimetrik Dimetil L-Arjinin (ADMA), Simetrik Dimetil L-Arjinin (SDMA)' dir. Bu türevler, proteinlerdeki arjinin kalıntılarının Protein Arjinin Metil Transferaz enzimleri (PRMT) tarafından metilasyonu sonucu post-translasyonel olarak meydana gelmektedirler. Bu işlemde metiyonin ve ATP' den sentezlenen S-Adenozilmetiyonin metil donörü olarak hizmet etmekte ve S-Adenozilhomosisteine daha sonra da homosisteine hidroliz olmaktadır. Homosisteinin remetilasyon yolağında yeniden metillenmesi ile metiyonin oluşmaktadır (14, 99, 111, 137, 179, 197). Şekil.2.2' de ADMA biyosentezi ve metabolizması özetlenmiştir.



Şekil.2.2. İnsan vücudunda ADMA biyosentezi ve metabolizması

Proteinlerdeki arjinin kalıntılarının metilasyonu, PRMT enzimlerinin katalize ettiği reaksiyon ile proteinin yapısında bulunan arjinin amino asidinin guanidino azotu veya azotlarına bir veya iki metil grubu eklenmesiyle

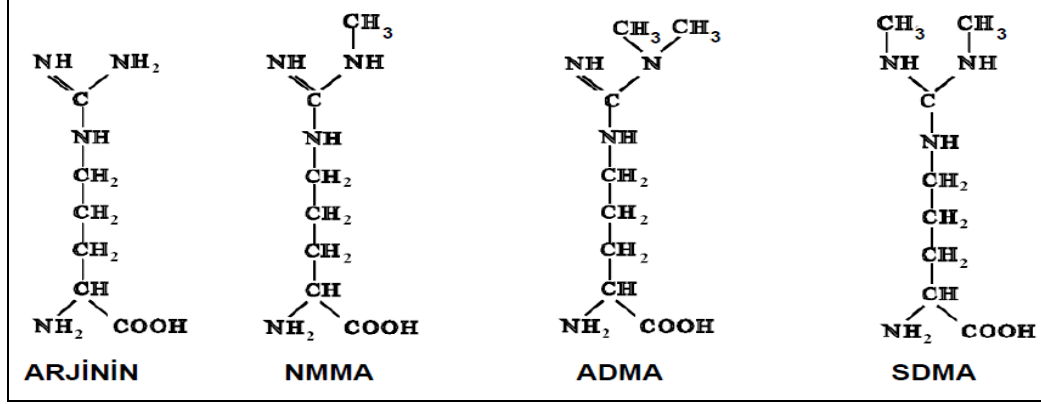
gerçekleşmektedir. PRMT enziminin iki ana tipi vardır. Her ikisi de arjininin monometillenmesini sağlayabilir, böylece NMMA oluşur. Ancak ikinci bir metil grubu eklendiğinde oluşacak ürün PRMT enziminin tipine bağlıdır. Tip-1 PRMT enzimi, sadece bir guanidino azotunu dimetilleyerek ADMA oluşumunu katalizlerken, Tip-2, her iki guanidino azotlarını monometilleyerek SDMA oluşumunu gerçekleştirir (Şekil.2.3)



Şekil.2.3. Proteinlerdeki arjinin kalıntılarının protein metiltransferazlar ile metilasyonu

Protein hidrolizi sonucu hücreden salıverilen ADMA, diğer hücreler tarafından katyonik aminoasit transport (KAT) ailesinin γ^+ taşıyıcıları ile alınmaktadır (14, 193, 196, 212).

Çoğu memeli dokuları ve vücut sıvılarında protein turnover ürünü olarak serbest aminoasitler halinde bulunan metillenmiş arjininler vücuttan temel olarak üriner sistemle atılırlar (196). Şekil 2.4'te Arjinin ve arjininin metillenmesiyle oluşan ADMA, SDMA ve NMMA'in moleküler formülleri görülmektedir.



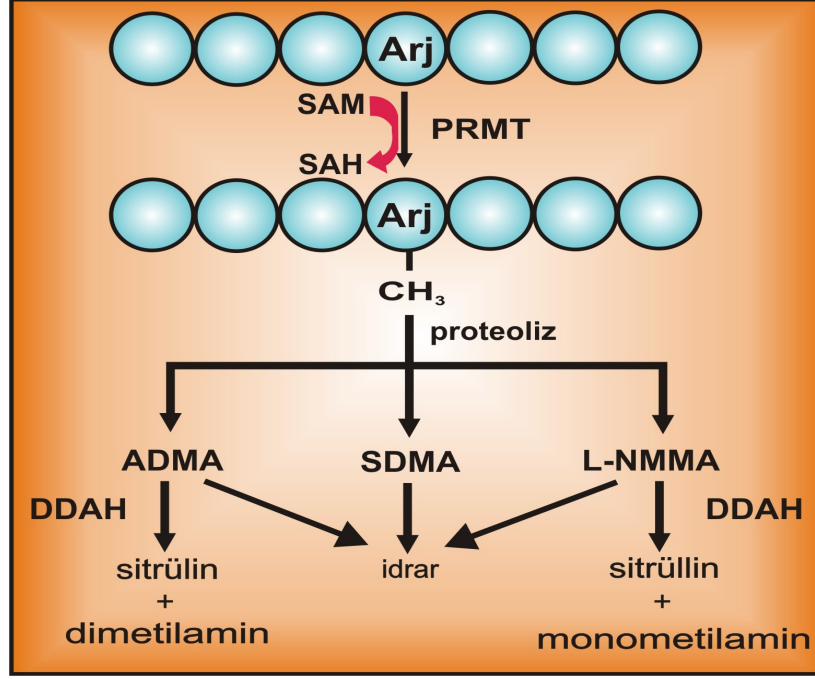
Şekil.2.4. Arjinin, NMMA, ADMA ve SDMA'nın moleküler formülleri.

NMMA ve ADMA, NOS enzimlerinin geri dönüşümlü ve yarışmalı inhibitörleridir. Çeşitli memeli türlerinde NMMA ve ADMA'nın endojen NOS düzenleyici olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Plazma NMMA derişimi ADMA'nın yaklaşık 1/10'u kadardır. SDMA, NOS inhibisyonu yapmamasına karşın hücrelere girişte ADMA ve L-Arjinin ile aynı mekanizmayı kullandığından diğerlerinin etkisini dolaylı olarak sınırlandırabileceği düşünülmektedir (36, 41, 49, 91, 103, 191, 199, 213).

Son zamanlarda plazma ADMA konsantrasyon artışı kardiyovasküler risk faktörü olarak düşünülmektedir. Ayrıca ADMA düzeyindeki artışın hiperkolesterolemi, ateroskleroz, hipertansiyon, kronik renal yetmezlik ve kronik kalp yetmezliği ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Tüm vücut sıvılarında ve birçok dokuda bulunan Dimetilarjinin DimetilAminoHidrolaz (DDAH; E.C. 3.5.3.18) enzimi, özellikle ADMA ve SDMA gibi çift metil grubu bulunduran arjininleri yıkıma uğratarak sitrüllin ve metilaminleri (CH_3NH_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$) oluşturmaktadır (48, 89) (Şekil.2.5).

DDAH enzimin farklı dokularda aktivite gösteren DDAH-1 ve DDAH-2 olmak üzere iki farklı izoenzimi saptanmıştır. DDAH-1, nöronal NOS içeren dokularda daha yoğun DDAH-2 ise endotelial NOS içeren dokularda (Örn; kalp, plasenta) baskın olarak eksprese olmaktadır (94). Bu izoenzimlerin renal ekspresyonlarının regülasyonu Anjiyotensin II (Anj II) ile sağlanmaktadır (127).



Şekil.2.5. Metillenmiş arjinin türevlerinin oluşumu ve metabolizması

eNOS ve nNOS primer olarak Ca^{+2} /kalmoduline bağımlı yolda düzenlenirken, iNOS ADMA ve NMMA tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir.

DDAH, ADMA'yı metabolize ederek plazma ADMA düzeylerini düzenlemekte ve bu şekilde nitrik oksit biyoyararlılığını belirlemektedir (36, 204). Kan damarlarındaki NO aktivitesi, kan damarlarının endotel bağımlı relaksasyon faktörü'ne (EDRF) verdiği yanıtlara aracılık eder (131), vasküler remodeling'i önler (52, 184) kan basıncının ve renal vasküler direncin stabil kalmasını sağlar (15, 38, 40). Ayrıca, henle kulpunun yukarı doğru çıkan kalın kolu ile toplayıcı kanallara Na^{+} girişini inhibe eder ve tuz duyarlılığını önler (128, 141, 143, 163). Sonuç olarak, DDAH kardiyovasküler ve renal sistemlerin homeostatik bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Normal protein turnover'i neticesinde oluşan ve NOS enzimi inhibe eden ADMA ve NMMA'nın kontrollü olarak ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan DDAH enzimi NO radikalinin işlev gördüğü tepkimelerin sürdürülmesinde kritik önem taşımaktadır.

Diğer taraftan okside LDL, proinflamatuvar sitokinler, hiperhomosisteinemi, hiperglisemi ve enfeksiyöz ajanlar gibi patolojik uyaranların endotelial oksidatif stresi indükleyerek DDAH inaktivasyonu ve arjinin türev aminoasitlerinin artışına yol açmak suretiyle NOS inhibisyonuna neden olduğuna yönelik bazı bulgular edinilmiştir. Aktif bölgedeki sülfidril grubu nedeniyle DDAH enzimi oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Özellikle hiperhomosisteinemi durumunda, homosistein DDAH enzimi ile disülfid bağı oluşturmakta, bu da enzimin aktivitesini kaybetmesine ve dolayısıyla ADMA birikimine ve nitrik oksit sentaz aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (33, 34, 50, 53, 64, 91, 118, 178, 192).

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz veya homosistein ile üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), DDAH'ı post-transkripsiyonel olarak inhibe etmektedirler (65,190). DDAH aktivitesinin inhibisyonu metilarjininlerin birikmesine neden olmakta, ADMA ve NMMA'nın yıkımının azalmasına bağlı birikimleri ortaya çıkmaktadır. Endojen NOS inhibitörleri olan bu arjinin türevlerinin ortamda artması ile NO sentezi ve bağımlı vasküler relaksasyon mekanizmaları bozularak vazokonstriksiyon meydana gelmektedir (91, 172, 175, 211).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda DDAH-1 enziminin, moleküler ağırlığı yaklaşık 33 kDa olan 285 aminoasitlik bir protein olduğu, ADMA'nın metabolizması için Km değerinin, 0.18 mM olduğu gösterilmiştir (124). İnsan ve sıçanlarda plazma ADMA düzeyleri 0.3-0.5 µmol/L olarak bulunmuştur (198). Hücre içi ADMA konsantrasyonları DDAH'ın Km değerinden daha fazladır. Bu yüzden, hücre içi ADMA konsantrasyonları DDAH ekspresyonu veya aktivitesindeki değişimlere hassastır (77, 105). Wang ve ark., sıçanlara intravenöz enjeksiyon ile DDAH-1' i hedef alan small interference RNA (siRNA) vererek karaciğer, böbrek ve kan damarlarındaki DDAH ekspresyonunda % 30-40 azalma olduğunu ve 72 saat sonra yapılan ölçüm sonucunda da serum ADMA konsantrasyonunun %20-30 arttığını gözlemişlerdir. Aynı işlemler DDAH-2' yi hedef alan siRNA ile tekrarlanmış, fakat plazma ADMA düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (204).

2.3. ADMA ve NMMA Regülasyonu

Protein metilasyonu sonucu oluşan ve proteinin hidrolizi ile salıverilen ADMA ve NMMA nükleusta baskın olarak bulunmaktadır. ADMA konsantrasyonu, NMMA konsantrasyonundan 10 kat daha yüksek olduğu için ADMA NO biyosentezinin baskın olan inhibitörüdür. ADMA ve SDMA, vücuttan üriner atılım yolu ile uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca, memelilerde ADMA ve NMMA konsantrasyonları iki tane DDAH izoenzimi ile düzenlenmektedir. DDAH-1, nNOS'un üretildiği nöronal dokuda; DDAH-2, eNOS'un üretildiği kalp ve plasentada yüksek miktarda bulunmaktadır (189). Her iki izoenzimde böbrek ve karaciğerde yüksek miktarlarda eksprese edilmektedir.

2.4. Dimetilarjinin DimetilAminoHidrolaz (DDAH) Enzimi

ADMA ve SDMA, 1970 yılında Kakimoto ve Akazawa tarafından insan idrarından normal metabolizma ürünleri olarak izole edilmiştir (70). Ogawa ve ark. ADMA ve NMMA'yı metilamin veya dimetilamine hidroliz ederek NOS aktivitesini düzenleyen DDAH enzimini ilk kez 1987'de tanımlamışlar, 1988'de ise sıçan böbreğinden saflaştırmışlardır (122-124). 1999 yılında ise Vallance ve Leiper isimli iki araştırmacı bakteri, koyun, fare, sıçan ve insanlarda eksprese edilen iki DDAH izoenziminin olduğunu açıklamışlardır (93, 188). Tojo ve ark. (182, 183) ise DDAH ve NOS izoenzimlerinin böbrek ve kan damarlarında farklı bölgelerde eksprese edildiğini belirtmişlerdir. DDAH ve NOS'un ikisinin de eksprese edildiği hücrelerde NO aktivitesi, DDAH ile regüle edilen hücresel ADMA konsantrasyonundaki değişimler ile düzenlenmektedir (93, 204, 214).

DDAH, bir molekül ADMA'nın bir molekül sitrüllin ve bir molekül dimetilamine metabolizmasını katalizleyen bir enzimdir. Bu katalitik reaksiyona spesifik kofaktörlere ait net bilgiler bulunmamaktadır. Sıçan böbreğinden saflaştırılmış DDAH enziminin pH = 5.2-6.5 arasında maksimum aktiviteye sahip olduğu ve enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 55 °C olduğu bulunmuştur (123, 124). Enzim 37°C'de ve pH = 5.0 -8.5 arasında inkübe edildiğinde yaklaşık bir saat stabil kalmaktadır (93, 122, 123, 188). Knipp ve ark. (23, 80), DDAH -1 enziminin Zn⁺² içeren bir protein olduğunu,

fakat Zn^{+2} nin katalitik işlemlerde yer almadığını sadece enzimin tamamen aktif forma gelmesi için gerekli olduğunu rapor etmişlerdir (80).

Leiper, Vallance ve ark. (93, 189), DDAH'ın hücre içindeki ADMA'yı metabolize ettiğini fakat SDMA'yı metabolize etmediğini gözlemişlerdir. DDAH'ın ADMA'ya olan spesifik aktivitesi moleküler yapısı ile ilgili bir durumdur. Murray-Rust ve ark. (114), DDAH-1 üzerinde bir substrat bağlanma cebi tanımlamışlardır. Bu cep, ADMA'nın yan zincirindeki metillenmemiş azotun girebildiği küçük bir pordur. Substrat bağlandıktan sonra por kapanarak aktif bölge cebinde ADMA'nın $(CH_2)_3$ – zincirleri ile Phe75 (Fenilalanin 75) arasında hidrofobik etkileşimler meydana gelmektedir. SDMA'nın iki azotunda da metil grupları bulunduğu için sterik ve elektrostatik olarak DDAH'ın bu asidik cebine bağlanması mümkün değildir (78).

Vallance ve ark.(198), son dönem böbrek hastası bireylerin plazmalarında ADMA ve SDMA'nın biriktiğini ve biriken ADMA'nın NOS'u inhibe ettiğini gözlemişlerdir. Bu birikim, ADMA'nın DDAH ile metabolize edilmesinde ve SDMA'nın da böbreğin fonksiyonunu yitirmesi nedeniyle atılımında sorun olması ile açıklanmaktadır (189). Bu yüzden, plazma ADMA düzeyi primer olarak DDAH ekspresyonunu ve aktivitesini etkileyen faktörlere bağlı iken, plazma SDMA düzeyi, renal atılım oranına bağlıdır (49, 56, 120, 121, 178, 198).

İkinci bir DDAH izoenzimi (DDAH-2) tanımlayan Leiper ve ark. (93), DDAH-2 ekspresyonunun dokunun toplam DDAH aktivitesinin minör fraksiyonunu oluşturduğunu gözlemişlerdir. Fakat sonraki çalışmalar, DDAH-2'nin NO biyoaktivitesini belirleyen endotel hücrelerinde baskın olarak bulunduğunu göstermiştir (188, 204).

Leiper ve ark. (90), 2007 yılında DDAH-1'in kristal yapısını tanımlamışlardır. İnsanlarda DDAH geninin orijinal formu olduğu düşünülen DDAH-1 ile DDAH-2' nin aminoasit düzeyinde %62, nükleotid düzeyinde %63 homoloji gösterdiği bulunmuştur (188, 189).

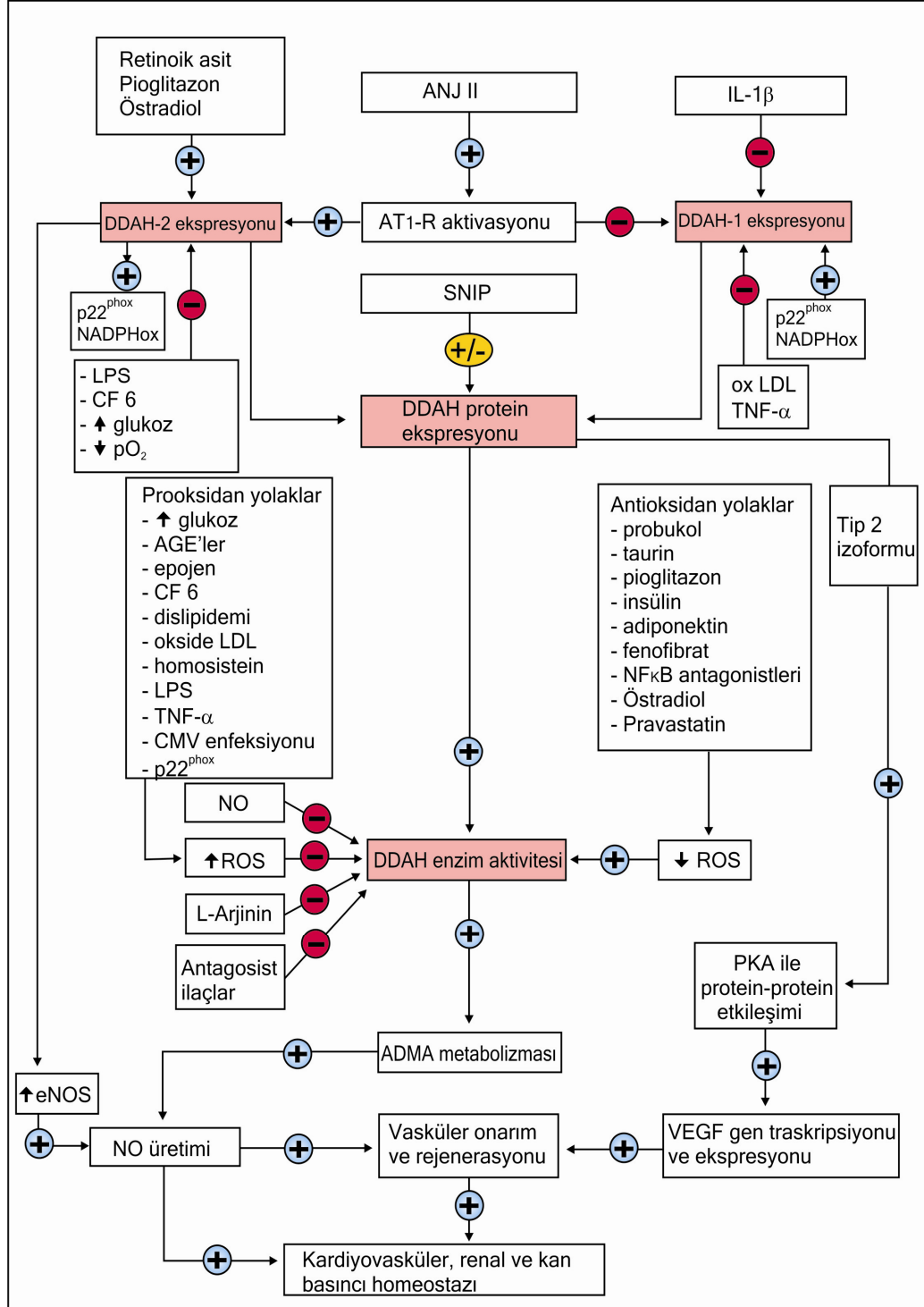
Sıçan böbreğinde yüksek oranda eksprese edilen DDAH-1 enzimi, insanlardaki DDAH enzimi ile %93 oranında identiktir (122, 123) ve benzer enzimatik özellikler göstermektedir (93).

ADMA klirensi için şimdye kadar tanımlanmış iki majör yolak bulunmaktadır (118). ADMA hem hücreden salınmakta hem de hücrelere alınmaktadır. Bütün hücrelerde oluşan ADMA, hücre içinde DDAH enzimi ile sitrüllin ve dimetilamine metabolize olmakta veya y^+ taşıyıcıları ile hücre içinden plazmaya taşınmaktadır. (179). ADMA'nın büyük bir kısmı DDAH-1 ekspresyonunun fazla olduğu karaciğer ve böbrekler tarafından metabolize olmakta, az bir kısmı da böbrekler tarafından atılmaktadır (179). DDAH geni, NOS geni ile aynı bölgelerde eksprese edilmektedir. DDAH-1 beyin gibi nNOS'un eksprese edildiği bölgelerde, DDAH-2 ise eNOS eksprese eden endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir (93). Böbreklerde DDAH ve NOS izoenzimlerinin lokalizasyonu çok daha karmaşıktır.

2.5. DDAH Genleri ve Proteinleri

2.5.1. Gen ve Protein Ekspresyon Çalışmaları

İnsan endotel hücrelerinde DDAH-2 geninin ekspresyonunun all-trans-retinoik asit, pioglitazon (PIO, antioksidan etkiye sahip bir peroksizom proliferasyonunu aktive edici reseptör-gama ligandı) ve östradiol ile arttığı, okside LDL ve coupling factor 6 (CF6) ile azaldığı gösterilmiştir (3, 112, 201). CF6, fosfolipaz A_2 'yi inhibe eden, ROS üretimini arttıran ve vazokonstriksiyonu indükleyen mitokondriyal ATP sentaz enerji iletim sisteminin esansiyel bir bileşenidir (175). DDAH-2 proteinin ekspresyonu da all-trans-retinoik asit, pioglitazon ve östradiol ile upregüle, CF6, lipopolisakkarit ve ROS üreten yüksek glukoz konsantrasyonları ile downregüle edilmektedir (3, 175, 201, 225). DDAH-1 proteininin ekspresyonu ise interlökin-1 beta (IL-1 β) ile arttırılırken, okside LDL veya Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) ile azaltılmaktadır (64, 160, 191) (Şekil.2.6).



Şekil.2.6. DDAH aktivitesini artıran ve azaltan faktörler

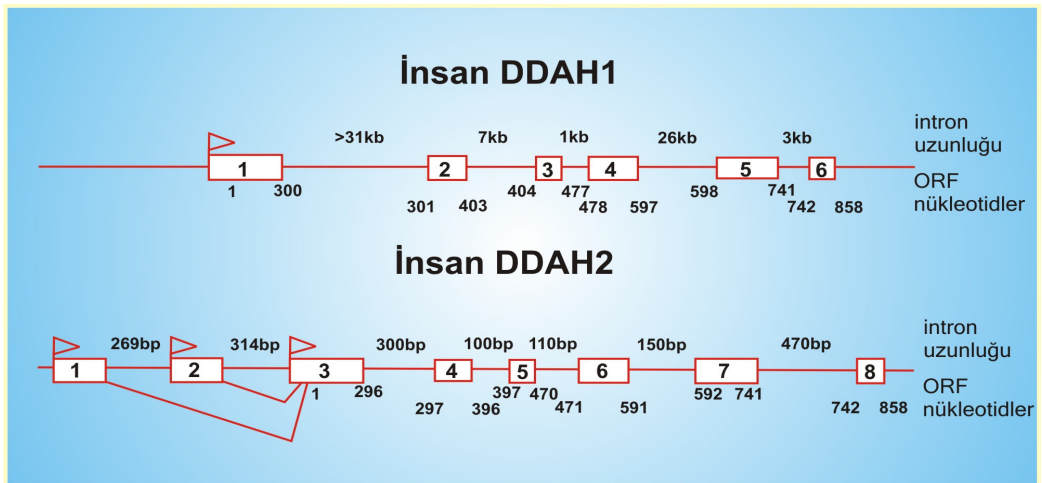
2.5.2. DDAH Genlerinin Kromozomal Yerleşimi

Tran ve ark. (188), floresan *in situ* hibridizasyon ve radyasyon hibrid haritalama tekniklerini kullanarak DDAH-1 geninin kromozom 1p22, DDAH-2 geninin ise kromozom 6p21.3'ün MHC III bölgesinde yerleşik olduğunu göstermişlerdir.

2.5.3. DDAH Gen ve Proteinlerinin Yapısı

DDAH enzimleri ile memelilerde arjinini modifiye eden diğer enzimler arasında biraz homoloji bulunmaktadır (93). Murray-Rust ve ark. (114), bakteri ve ilkel ökaryotlarda bulunan protein arjinin deiminazın (PAD) da arjinini sitrülline metabolize ettiğini ve bu enzimin DDAH ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. PAD evrimsel süreçte DDAH geni haline gelmiş olabileceği düşünülmüştür.

İnsan DDAH enzimi, 285 aminoasitlik tek bir proteini kodlayan 858 baz çiftlik açık okuma çerçevesi (ORF: Open Reading Frame) içermektedir. Leiper, Vallance ve ark. tarafından DDAH-1 ve DDAH-2 ile ilgili yapılan çalışmalar, kodlayıcı bölgenin 6 ekzona bölünmüş olduğunu göstermiştir. Bu ekzonlar, ekzon sınırları ile yüksek oranda korunmuştur. Buna karşılık, DDAH-1 ve DDAH-2'nin intron uzunluklarının birbirinden tamamen farklı olduğu bildirilmiştir (93, 188) (Şekil.2.7).



Şekil.2.7. İnsan DDAH-1 ve DDAH-2 geni

Tran ve ark. (188), DDAH-1 transkriptlerinin, açık okuma çerçevesinin 5' ucunda tek bir transkripsiyon başlama bölgesine DDAH-2 transkriptlerinin ise 5' uçta üç transkripsiyon başlama bölgesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Murray – Rust ve ark.(114), *Pseudomonas aureus* (PaDDAH)'tan izole edilen DDAH enziminin kristal yapısını incelemişler ve beş tane $\beta\beta\alpha\beta$ -modülü içerdiğini göstermişlerdir. Bu modüllerin pervane kanatları şeklinde dizilişleri ile merkezi negatif yüklü bir çekirdek yapı olan dar bir kanal oluşmaktadır. Bu çekirdek yapı, metil arjinin substratının guanidinopropil yan zincirinin tanınma bölgesidir. Bu kanal, metil arjinin yan zincirinin hidrolizini katalizleyen korunmuş aminoasit üçlüsünü içermektedir.

Bakteriyel DDAH enziminin kristal yapısı da incelenmiş, aktif bölgenin Cys–His–Glu (Glutamik asit) katalitik üçlüsünü içerdiği gösterilmiştir (114). Bu aktif bölgeler, farklı türler arasında çeşitlilik göstermektedir. ADMA, DDAH'ın bu aktif bölgesine hidrojen bağlarıyla tutunmaktadır. DDAH'ın Cys249'unun sülfür atomu ile ADMA'nın guanidin grubunun karbon atomu arasında katalitik reaksiyon meydana gelmektedir. PaDDAH enziminin bu sistein uzantısı yerine serin girdiğinde, enzimin çözünme ve katlanmasının olağan halini sürdürmesine karşın aktivitesini yitirdiği gözlenmiştir. Bu bölgede Cys249 ile birlikte bulunan His162 ve Glu114, DDAH'ın aktif bölgesindeki sisteinin aktive edilmesini sağlamaktadır (114).

Sığır, fare, koyun ve insanlarda da DDAH kristal yapısı incelenmiş ve DDAH-1'in katalitik bölgesinin Cys273, Asp126 ve His172; DDAH-2'nin katalitik bölgesinin ise Cys276, Asp125 ve His171'den oluştuğu gösterilmiştir (16, 47, 89, 114).

DDAH üzerinde aktif bölgeyi kapatan bir esnek ilmik ve bir substrat bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Frey ve ark. (47), sığır DDAH–1'in kristal yapısını incelemişler; arjinin modifiye eden diğer enzimlere benzer pervane kanadı benzeri katlanma içerdiğini ve farklı konformasyonlara girebilen esnek bir ilmiğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu ilmik, substratların aktif bölgeye girişini sağlayan kanalı açmak veya kapamak için bir kapak olarak rol oynamaktadır.

Fare, sığır ve insan DDAH-1 enzimlerinin yaklaşık %92, DDAH-2 enzimlerinin ise %95 homoloji gösterdiği bulunmuştur. Türler arasında substrat bağlanma ve kapak bölgesinde aminoasit sekans varyasyonları olduğu belirtilmiştir. DDAH-2' nin yapısının substrat bağlanma bölgesi hariç DDAH-1 ile aynı olduğu gözlenmiştir.

2.5.4. DDAH Genlerindeki Tek Nükleotid Polimorfizmler

Jones ve ark. (68), PCR (Polymerase Chain Reaction) ve SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analizleri ile insan DDAH-2 geninin promotör bölgesinde yaygın olarak gözlenen 6 polimorfizm tanımlamışlardır. DDAH-2'nin promotör bölgesinin -871. pozisyonunda gözlenen 6G/7G insersiyon/delesyon polimorfizm varyantında bazal DDAH-2 protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.

Valkonen ve ark. (192), Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study'de orta yaştaki 1609 tane Finlandiyalı bireyi incelemişler, DDAH-1 için 6, DDAH-2 için ise bir varyant tanımlamışlardır. DDAH-1 mutasyonu taşıyan bireyler arasında koroner kalp hastalığı meydana gelme olasılığının 50 kat yüksek olduğu bulunmuştur. DDAH gen mutasyonu taşıyan bireylerde hipertansiyon prevalansının da arttığı gözlenmiştir. Son zamanlarda, Ryan ve ark. (142), kalp ameliyatına giren rastgele seçilmiş 236 hastanın 107'sinin homozigot DDAH-2 -449G alleli taşıyıcısı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalar sonucu bu mutasyonun stres ve travma koşulları altında vasküler fonksiyonu etkilediği düşünülmüştür.

2.6. DDAH Aktivitesi veya ADMA Tarafından Gen Ekspresyonunun Regülasyonu

DDAH, ADMA konsantrasyonları ve NO oluşumundaki değişimlerin yanında birçok genin ekspresyonunu da düzenlemektedir (158). Örneğin ADMA, insan umblikal ven endotel hücrelerinde lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen doku faktörü ekspresyonunu arttırmaktadır (225). Smith ve ark. (158), insan koroner arter endotel hücrelerini 2-100 µM ADMA ile inkübe etmişler ve bu hücrelerdeki 142 genin bazılarının 1.7 kattan fazla upregüle, bazılarının ise downregüle olduğunu göstermişlerdir. ADMA ile uyarılan bu

genler arasında BMP2K (bone morphogenetic protein 2 inducible kinase), BMPR1A (bone morphogenetic protein receptor 1A), dekapentaplejik-5 ailesi, smooth muscle action (SMA)-ilişkili protein 5 (Smad-5) ve PRMT3 (protein arginine methyl transferase 3) bulunmaktadır. Transforming growth factor-beta (TGF β) süper ailesine ait çok fonksiyonlu büyüme faktörleri olan BMP'ler (bone morphogenetic protein), BMP sinyal yolağı, iskelet sistemi, renal ve vasküler sistemde önemlidir. (57, 61, 158). BMP2K, osteoblast farklılaşmasını devam ettiren bir serin/treonin protein kinazdır (71). ADMA, BMP2K üzerindeki etkileri ile osteoblast farklılaşmasını ve osteokalsin ekspresyonunu azaltmaktadır (158). PRMT3, proteinlerdeki arjinin rezidülerini metillemektedir. ADMA pozitif feedback etkisi ile PRMT3 transkripsiyonunu arttırmaktadır.

DDAH, anjiyogenezde yer alan genlerin ekspresyonunu da düzenlemektedir (158, 159, 207, 221).

ADMA, endotel hücrelerinin motilitesini ve anjiyogenezi bozan RhoA (ras homolog gen ailesi A üyesi) ve Rho kinaz' ı aktive etmektedir.

VEGF (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü), TGF β (transforming growth factor beta) ve bFGF (fibroblast growth factor) gibi büyüme faktörleri aracılığı ile gerçekleşen NO artışı, anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır (12, 33, 58,133). In vitro bir çalışmada NOS inhibisyonunun TGF β ' nin anjiyogenik etkilerini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (132, 232, 233). Cooke (33), ADMA' nın NOS/NO yolağını bozarak endojen kaynaklı bir anjiyogenez inhibitörü olarak rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca normal ve apoE eksik farelerde, bFGF' nin anjiyogenez üzerine olan etkilerini ADMA' nın engellediğini bildirmiştir. Bu etki L-arjinin ile tersine çevrilebilmektedir.

Hasegawa ve ark. (54) sığır aort endotel hücre kültürlerinde DDAH-2 geninin transfeksiyonunun VEGF'yi transkripsiyonel olarak aktive ettiğini kaydetmişlerdir. Tokuo ve ark. (186), small GTPaz sıçan sarkoma (Ras) yolağı regülatörü olan neurofibromin 1'in (NF1) DDAH-1 enziminin C-terminal bölgesine ve sistein/serinden zengin bölgesine doğrudan bağlandığını göstermişlerdir. Bu bölgeler spesifik protein kinaz A (PKA) içeren bölgelerdir. DDAH-1'in NF-1'e bağlanması, PKA tarafından NF-1'in fosforilasyonunu

arttırmaktadır. Bu çalışmalar DDAH' ın iki farklı mekanizma ile fonksiyonlarını gerçekleştirdiğini göstermektedir: ADMA'nın hidrolizi ve protein-protein etkileşimi. Sıçan endotel hücrelerinde yapılan çalışmalar ile DDAH-2' nin NOS ekspresyonunun olmadığı nükleusta yerleşik olduğu ve protein-protein etkileşimlerinin gen transkripsiyonunu düzenlediği gözlenmiştir (204). Sıçan vasküler düz kas hücrelerinin nükleusunda da yerleşik olarak bulunan DDAH-2'nin, anjiyogenez ve endotel hücre motilitesi üzerinde güçlü etkileri bulunan VEGF geninin transkripsiyonuna neden olmaktadır (4, 92, 127).

2.7. DDAH Eksprese Eden Bölgeler ve İşlevleri

2.7.1. DDAH Organ Dağılımları

DDAH-1 ve DDAH-2 sitoplazmada baskın olarak bulunan enzimler olmasına karşılık DDAH-1 endotel hücre lizatlarında da gözlenmiştir (17). DDAH-1, özellikle karaciğer ve böbrek başta olmak üzere NOS'un eksprese edildiği tüm dokularda eksprese edilmektedir (116, 117, 127, 185). İnsanda karaciğer ve böbrek, ADMA metabolizmasının gerçekleştiği majör bölgelerdir. ADMA'nın bu organlara girişi negatif bir veno-arteriyel gradient ile sağlanmaktadır (116, 117). DDAH-1' in karaciğer ve böbrekteki ADMA sirkülasyonunun düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir. DDAH-1; pankreas, ön beyin, aort ile peritoneal nötrofil ve makrofajlarda da oldukça fazla eksprese edilmektedir (76, 188). DDAH-1'in fetal ve erişkin dokularında ekspresyonu eşdeğer düzeydedir (188). Heterozigot DDAH-1 eksikliği olan farelerde, iskelet kası, akciğer, beyin ve kalpte DDAH-1 ekspresyonunun azaldığı, DDAH-2 ekspresyonunun ise değişmediği gözlenmiştir. Bu farelerin, pulmoner hipertansiyona neden olan pulmoner vasküler sistem anomalilerine sahip olduğu bildirilmiştir (90).

DDAH-2, tüm fetal dokularda yüksek düzeylerde bulunmakla birlikte yetişkinlere göre konsantrasyonları daha düşük ve ekspresyon bölgeleri daha selektiftir (188). DDAH-2, eNOS ekspresyonunun gerçekleştiği vasküler endotelde baskın olarak bulunur, ancak başta böbrek olmak üzere kalp ve plasentada da eksprese edilmektedir (3, 127, 188, 204). DDAH-2, iNOS eksprese eden dalak, timus, periferik lökositler, lenf nodları ve kemik iliği gibi

immün sistem dokularında da eksprese edilmektedir (188). İmmun sistem hücrelerinde DDAH-2' nin eksprese edilmesi bu enzimin romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklara katılıyor olabileceğini düşündürmektedir. DDAH-2'nin iNOS ile beraber immün tolerans veya konak savunmasının ayarlanmasında bir role sahip olduğu da düşünülmektedir. Plazma ADMA düzeyleri artmış olan Sistemik Lupus Eritematozlu hastalarda da kardiyovasküler olayların arttığı kaydedilmiştir (28).

2.7.2. Kan Damarlarında DDAH Ekspresyonu ve İşlevleri

Kan damarları ve endotelde eksprese edilen ve sıçan arteriyollerinde biyoaktif NO'yu düzenleyen baskın izoenzimin DDAH-2 olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (88, 90, 96, 204).

Vasküler düz kas hücrelerinde nükleusunda bulunan DDAH'ın ADMA metabolizmasını düzenleyerek iNOS ekspresyonunu modüle ettiği in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Bu olay, IL-1 β aktivasyonundaki değişimler ile gerçekleşmektedir. IL-1 β , DDAH protein ekspresyonunu ve DDAH enzim aktivitesini arttırmaktadır. DDAH ayrıca sitokinlerle indüklenen NO üretimini düzenleyebilmekte ve iNOS üzerindeki etkileri ile aterosklerozdaki vasküler hasara katılabilmektedir (191, 204).

Achan ve ark. (3), all-trans-retinoik asitin DDAH ekspresyonunu artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir. All-trans-retinoik asit, vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinin anjiyogenik yanıtlarını arttıran, hücresele proliferasyonu inhibe eden, vasküler farklılaşmayı ilerleten ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatan bir A vitamini türevidir. Endotel hücreleri all-trans-retinoik asit ile muamele edildiğinde, DDAH-2 gen ve protein ekspresyonunun ve promoter aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (3).

DDAH ayrıca anjiyogenez ve endotel onarımında yer almaktadır. Heterozigot DDAH-1 eksikliği olan farelerde pulmoner arter endotel hücrelerinin motiliteleri bozulduğu için anjiyogenez defektleri gözlenmektedir. Bu etkiler, RhoA ve Rho kinazın aktivasyonu aracılığı ile olmaktadır. DDAH'ın upregülasyonu, anjiyogenezi arttıran güçlü bir ajan olan VEGF'nin mRNA ekspresyonunu arttırmaktadır (4, 159, 191, 221).

Patschan ve ark. (134), ADMA'nın NOS enzimini inhibe ederek NO sentezini azalttığını ve süperoksit oluşumunu arttırdığını kaydetmişlerdir. Bu çalışmalar DDAH'ın kan damarlarının endotel hücrelerinde NO oluşumu, NO yanıtları ve anjiyogenezde önemli olduğunu göstermiştir.

2.7.3. Böbreklerde DDAH Ekspresyonu ve İşlevleri

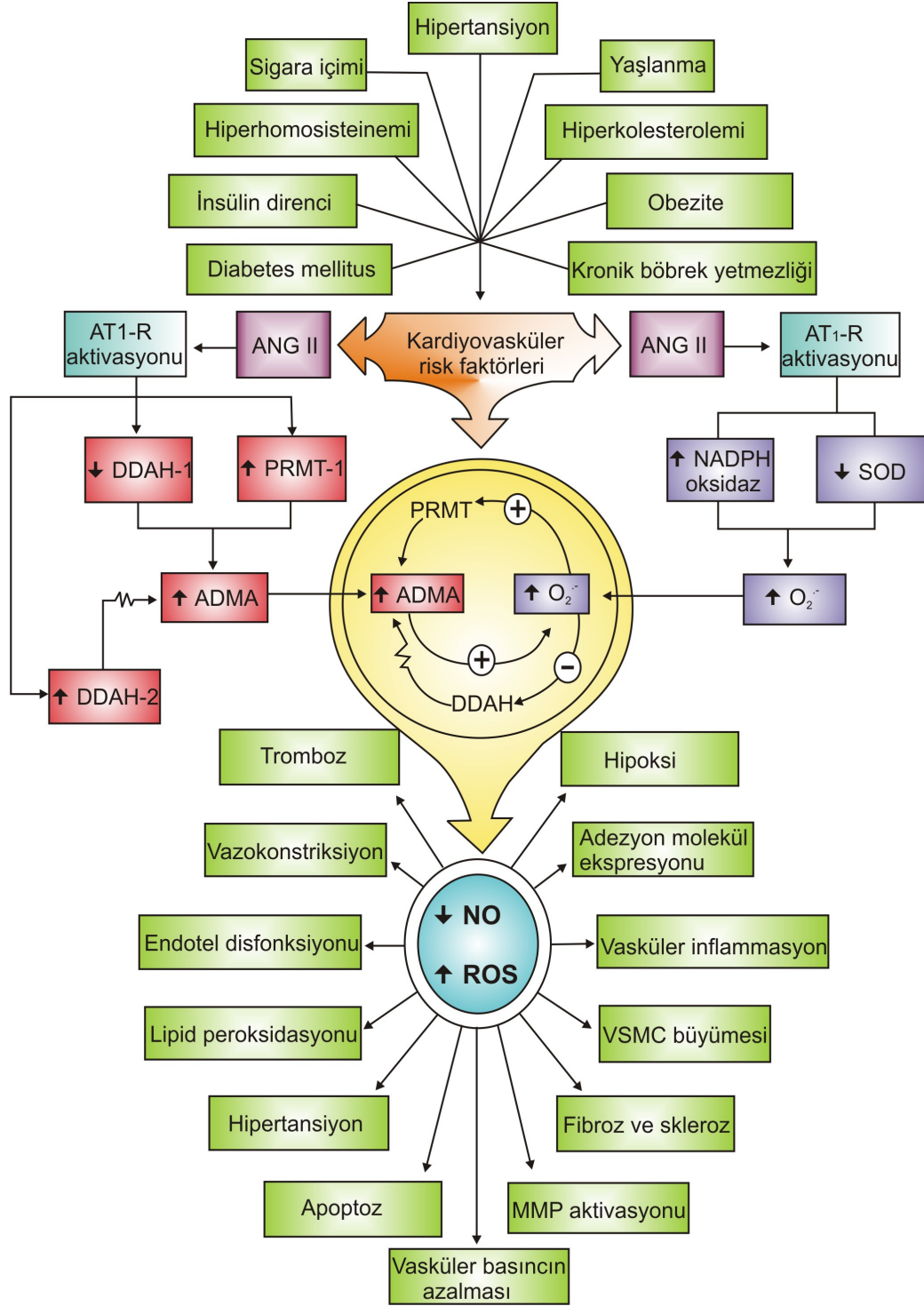
Sıçan böbreğinde mikrovasküler endotel hücreleri ve henle kulpunun yukarı doğru çıkan kalın kolunun (TAL) hücreleri eNOS eksprese etmektedir. nNOS ise makula densa segmenti, glomerulün Bowman kapsülü ve toplayıcı kanalların tübüler epitel hücrelerinde eksprese edilmektedir. nNOS'un proksimal tübülde (PT) bulunmamasına rağmen proksimal tübül hücre fonksiyonunu düzenlediği gösterilmiştir (216). iNOS, PT, TAL, distal kıvrımlı tübül (DCT) ve toplayıcı kanalların arasında kalan hücreleri içine alan tübüler epitelde eksprese olmaktadır (182, 185). DDAH bu hücrelerde eNOS, nNOS ve iNOS ile beraber yerleşik olarak bulunmaktadır (127, 182, 185, 217, 220).

Sıçanlarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, DDAH-1'in PT' de yerleşik olduğunu göstermiştir. DDAH-2 ise TAL, makula densa segmenti, DCT, kortikal ve medullar toplayıcı kanallarda yerleşik olarak bulunmaktadır (127, 185).

Sıçanların henle kulpunda ADMA, L-NMMA ve SDMA ile mikropenfüzyon çalışması yapılmış ve bu metil arjininlerin henle kulpunun lümeninden arjinin alımını inhibe ettiği gözlenmiştir. Bunun nedeni muhtemelen hepsinin y+ transport sistemini kullanmalarıdır. ADMA ve L-NMMA makula densa'da NOS'u inhibe etmektedir. Bu yüzden ADMA'nın DDAH tarafından metabolize edilmesi, NOS eksprese eden intraselüler bölgelere nefronlardan NOS substratı alımını arttırmaktadır (185).

2.8. Hastalıklarda DDAH Ekspresyonu

Zoccali ve ark.'nın yaptığı bir seri epidemiyolojik çalışmada ADMA'nın kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalığı ve bu hastalarda kardiyovasküler hastalığın gelişiminde (234-238) güçlü bir bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil.2.8. Kardiyovasküler ve renal hastalıklarda ADMA' nın regülasyonu ve diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkisi

2.8.1. Hipertansiyon ve ADMA

Achan ve ark, normal insanlarda ADMA infüzyonu sonrasında kan basıncının ılımlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir (2). Leiper ve ark. (90), heterozigot DDAH-1 eksikliği olan farelerde ADMA birikimi olduğunu kaydetmişlerdir. Bu birikim, vasküler NO sinyal iletiminin azalmasına, endotel disfonksiyona, sistemik vasküler direncin ve sistemik/pulmoner arter basınçlarının artmasına neden olmaktadır. Arrigoni ve ark. (8), 3 gün hipobarik hipoksiye maruz bırakılarak pulmoner hipertansiyon geliştirilen yeni doğan domuzlarda DDAH-2 enzim ekspresyonunun ve aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Transgenik olarak aşırı DDAH-1 eksprese eden farelerde sistolik kan basıncı, sistemik vasküler direnç ve kardiyak stroke hacminin azaldığı gözlenmiştir (36). Bu bulgular DDAH enziminin pulmoner ve sistemik vazokonstriksiyonu önlemede özel bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Diğer taraftan, erişkin sıçanlara DDAH-1 veya DDAH-2'yi hedef alan siRNA' lar intravenöz olarak enjekte edildikten 3 gün sonra telemetri ile kan basınçları ölçülmüş ve hiç değişim olmadığı gözlenmiştir. Bu hayvanların serum ADMA konsantrasyonlarında %30 artış olmasına rağmen kan basınçlarında herhangi bir değişim gözlenememiştir. Bu sonuçlara göre yeni doğanlarda kan basıncı artışı için 3 gün yeterli iken erişkinlerde bu sürenin yeterli olmadığı düşünülmüştür (204).

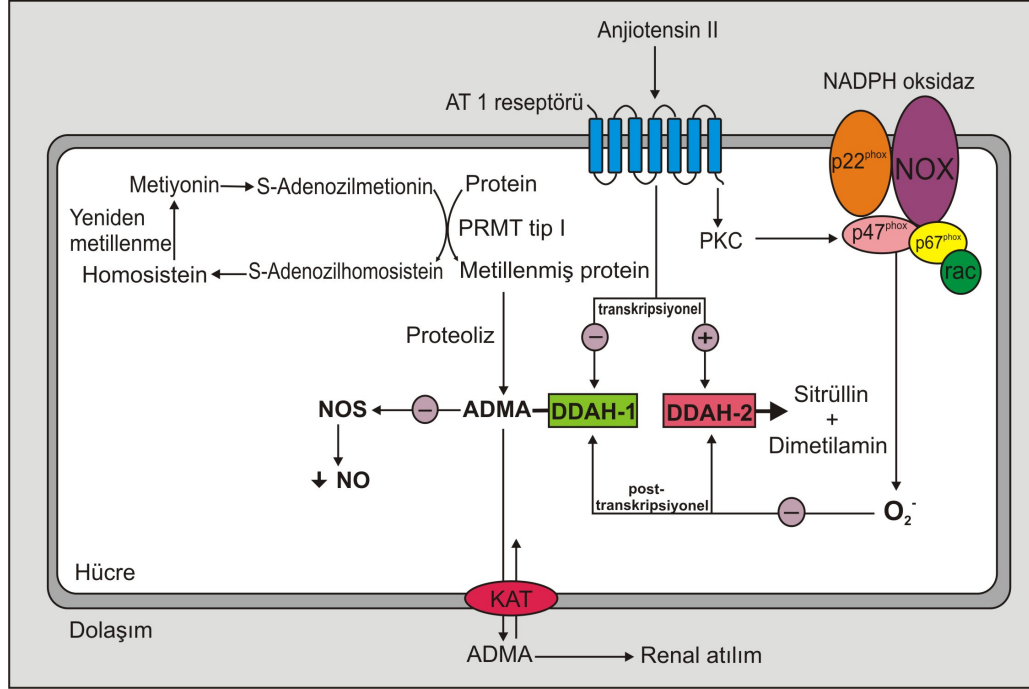
Esansiyel hipertansiyona sahip insanlarda endotel disfonksiyonu ve azalmış NOS aktivitesi ile ilgili çalışmalar yapılmış, kan basıncı ile ADMA arasında bir ilişki saptanamamıştır (15, 108, 129, 148, 152, 205). Fakat esansiyel hipertansiyonlu hastaların plazma ADMA düzeylerinin arttığını gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur (35, 62, 135, 170).

İnsanlarda renin sistemin ADMA üzerindeki etkileri çalışılmasına rağmen DDAH aktivitesi üzerindeki etkileri henüz yeterince incelenmemiştir. Bazı çalışmalarda Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI) veya Anjiyotensin reseptör bloke edici ajanların (ARB), hipertansiyon, kronik böbrek hastalığı, metabolik sendrom veya diabetes mellitus (DM) hastalarının plazma ADMA düzeylerinde azalmaya neden olduğu kaydedilmiştir (10, 30, 37, 62, 63, 115, 121, 125, 141, 151). Bazı çalışmalarda ise hipertansiyon

veya koroner arter hastalığı olan bireylerde hiç değişim gözlenmemiştir (37, 210). Bu zıtlıkların ADMA ölçümündeki problemlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

İnsan umblikal ven endotel hücreleri Anjiyotensin II (Anj II) ile 24 saat inkübe edilmiş, PRMT ekspresyonunun arttığı, DDAH aktivitesinin azaldığı ve ortama salınan ADMA miktarının iki katına çıktığı gözlenmiştir (31). Bu etkiler anjiyotensin reseptör (AT_1-R) antagonisti ile bloke edilmektedir. Erişkin farelere günde kg başına 60 mg olacak şekilde 4 hafta süreyle subkutan olarak Anj II enjekte edilmiş ve dolaşımdaki ADMA'nın 4 kat arttığı saptanmıştır (55). Anj II ile gerçekleşen ADMA'daki bu artışın DDAH ekspresyonu veya aktivitesindeki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Onozato ve ark. (127), DDAH-1'in proksimal tübüler hücrelerde, DDAH-2'nin ise arteriolün merkezinde, makula densa ve toplayıcı kanallarda eksprese edildiğini gösterdikleri sıçan böbrek korteks kesitlerinde Anj II'nin DDAH-1'in AT_1-R bağımlı downregülasyonuna, DDAH-2'nin ise AT_1-R bağımlı upregülasyonuna neden olduğunu gözlemişlerdir. Yani Anj II, DDAH ekspresyonu üzerinde izoenzime spesifik etkilere sahiptir ve bu etkilerini AT_1-R aktivasyonu aracılığı ile yapmaktadır.

Günümüzde yapılan çalışmalar, DDAH'ın Anj II-indüklü inflamasyonda mutlak bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Tojo ve ark. (182), sıçan böbreğinde AT_1-R aktivasyonunun DDAH ve eNOS ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca Chen ve ark. (31), endotel hücrelerini Anj II ile inkübe etmişler ve bu hücrelerde ROS üretiminin ve ADMA salınımının arttığını ve nitrit/nitrat düzeylerinin azaldığını kaydetmişlerdir. Bu sonuçlar, Anj II'nin eNOS ve DDAH'tan bağımsız olarak yeterli miktarda ROS ürettiğini düşündürmektedir (20, 213). ROS üretimi, inflamasyonda en önemli olaylardan biridir. ADMA TNF- α ve IL-8 gibi proinflamatuvar medyatörlerin üretimini artırır, NF- κB yolağını aktive eder ve monositlerin endotel hücrelere bağlanmasını artırır (31). Anj II TNF- α 'yı uyararak DDAH'ı inhibe etmektedir. DDAH aktivitesindeki azalma sonucu vasküler inflamasyonda ve disfonksiyonda artış meydana gelmektedir (Şekil.2.9) (64, 69).



Şekil.2.9. Anjiyotensin II ve NADPH oksidazlar ile oluşan süperoksit anyonunun DDAH enzimi dolayısıyla ADMA-NO metabolizması üzerindeki etkileri

2.8.2. Gebelik ve Preeklampsi

Normal gebelik sürecinde artan NO sentezi kan basıncının ve periferik vasküler direncin azalmasına neden olmaktadır (27). Gebelikte normalde plazma ADMA düzeyleri yanında L-arjinin düzeyleri de yaklaşık %50 azalmaktadır (46). Preeklampsi ve/veya fetüsün intrauterin büyüme kısıtlanması olduğu durumlarda veya HELLP (Hemolysis Elevated Liver enzymes and Low Platelets) sendromunda dolaşımdaki ADMA düzeyleri artmaktadır (43, 46, 60, 136, 145, 156).

Plasental venöz kanın maternal sistemik plazmadan 3 kat daha yüksek ADMA içerdiği kaydedilmiştir (104). Başka bir çalışmada ise plasental DDAH aktivitesinin karaciğer DDAH aktivitesinden 20 kat düşük olduğu bulunmuştur (156). Yapılan başka çalışmalarda preeklampsi gebelerde plazma ADMA düzeylerinde artış gözlenmezken HELLP sendromlu gebelerde %50 artış gözlenmiştir (95, 100, 156). Gebelik sırasında plazma

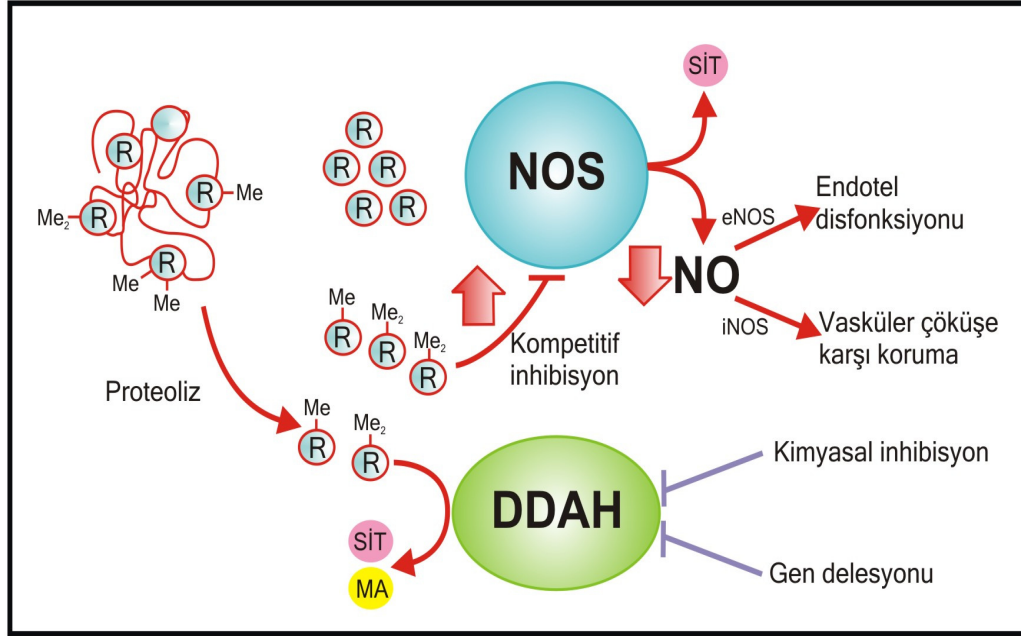
ADMA düzeylerinin kan basıncı, karaciğer ve böbrek fonksiyonları ile tamamen ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar artmış ADMA düzeylerinin preeklampitik ve HELLP sendromunun nedeninden çok sonucu olabileceğini düşündürmüştür.

2.8.3. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Ateroskleroz

Schnabel ve ark. (148), plazma ADMA düzeyinin koroner arter hastalığı olanlardaki muhtemel kardiyovasküler olayların bağımsız bir prediktörü olabileceğini öne sürmüşlerdir. Başka bir çalışmada koroner arter hastalığı olan bireylerde plazma ADMA ve homosistein düzeylerinin arttığı ve renal fonksiyonun bozulduğu gösterilmiştir (208). Ateroskleroz (111), periferik vasküler hastalığı (19), koroner arter hastalığı (208) veya sol ventriküler hipertrofisi (238) olan hastalarda da dolaşımdaki ADMA düzeyleri artmıştır. ADMA düzeyleri ayrıca hiperkolesterolemili, hiperhomosisteinemili hastalar, sigara içenler, yaşlılar, post-menopozal kadınlar ve karotid arter hastalarında artmıştır (18, 22, 64, 97, 98, 153, 165-167, 202, 208, 236).

Plazma ADMA düzeylerinin artışı DDAH ekspresyonu veya aktivitesindeki değişimlere bağlanmıştır. Farelerde oluşturulan hindlimb iskemi modelinde DDAH ve NOS protein ekspresyonlarının azaldığı, doku ADMA konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir (4). Endotel ve non-vasküler hücre kültürlerinde koroner ve periferik vasküler hastalık ile ilişkili yüksek homosistein düzeylerinin DDAH enzim aktivitesini azalttığı, bunun da ADMA birikimine ve NOS inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (167). Ayrıca hiperhomosisteinemili hastalardaki ADMA birikiminin renal fonksiyon bozukluğunun gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Şekil.2.10) (215).

Sigara içenlerde plazma homosistein ve ADMA düzeyleri artarken eNOS ekspresyonunun dolayısıyla NO üretiminin azaldığı gözlenmiştir (13, 66, 208). Nikotin, endotel hücrelerde DDAH-2 mRNA ve protein ekspresyonunun downregülasyonuna ve DDAH aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Özetle sigara içenlerdeki endotel disfonksiyonu ve kardiyovasküler hastalığın nedeninin DDAH-2 ekspresyonu ve fonksiyonundaki azalma sonucu oluşan ADMA birikimine bağlı eNOS fonksiyonu ve anjiyogenez inhibisyonu olduğu düşünülmektedir (56, 66).



Şekil. 2.10. DDAH aktivitesindeki değişimler sonucu oluşan ADMA birikimi ve patofizyolojik etkileri

2.8.4. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek hastalığı olan bireylerde plazma ADMA düzeylerinin arttığı (198), kan damarlarında NO yanıtlarının bozulduğu (205) ve kardiyovasküler olayların sıklığında belirgin bir artış olduğu (237) gözlenmiştir. Koroner arter hastalığı olan bireylerde plazma ADMA ile glomerüler filtrasyon hızı (GFR) arasında ters ilişki bulunmaktadır (208). Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı olan hastalarda endotel disfonksiyonu, subkutan arteriyollerin NOS aktivitesinde azalma (205), plazma ADMA düzeylerinde (74, 206) ve lipid peroksidasyon ürünlerinde (206) artma gözlenmiştir. Zoccali ve ark.'nın yüksek riskli populasyondaki epidemiyolojik çalışmalarında plazma ADMA düzeylerinin renal fonksiyonda ve kardiyovasküler hastalığın gelişiminde bağımsız bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (139, 237). Ayrıca köpeklerde kronik böbrek hastalığının erken aşamalarında koroner endotel fonksiyonun bozulmasının eNOS ve DDAH-2'nin mRNA'larının downregülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (177). Plazma SDMA düzeyleri ile renal fonksiyon parametreleri, plazma ADMA

düzeylerinden daha fazla korelasyon göstermektedir (75). Bu yüzden kronik böbrek hastalığında DDAH'ın regülasyonunu anlamak önemlidir.

Subtotal nefrektomi uygulanmış sıçanlarda nefrektominin derecesiyle orantılı olarak plazma ADMA konsantrasyonlarının yükseldiği, ADMA'nın renal klirensinin azaldığı ve kan basıncının arttığı gözlenmiştir. Bu sıçanlara DDAH-1 geninin transfeksiyonu hipertansiyonu önlemektedir (106). Bu bulgular, kronik böbrek hastalığında kan basıncının artışında DDAH'ın patojenik bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Kronik böbrek hastalığında plazma ADMA düzeylerindeki artışın renal ADMA atılımının düşmesi ve ADMA'nın DDAH ile katabolizmasının azalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kronik böbrek hastalığında DDAH aktivitesinin azalmasının oksidatif stres tarafından fonksiyonel olarak inhibisyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (10, 14).

ADMA TGF- β ekspresyonunun artmasına neden olarak böbrek hastalığının daha da ilerlemesine yol açmaktadır. Renal kütlesi cerrahi olarak azaltılmış sıçanlarda DDAH-1'in aşırı ekspresyonu renal TGF- β gen ve protein ekspresyonunu azaltmaktadır. TGF- β infüzyonu sonrası hipertansiyon oluşmakta, GFR ve renal medullar kan akışı azalmakta ve bu da böbreklerin fibrozisine neden olmaktadır (72, 107, 154).

2.8.5. Karaciğer Yetmezliği

Sağlıklı karaciğer dolaşımdaki ADMA ve L-Arjininin önemli miktarını alarak metabolize etmektedir (214). Karaciğer yetmezliği olan hastalarda dolaşımdaki ADMA ve L-Arjinin düzeylerinin arttığı görülmüştür (116, 157). İnsanlarda karaciğer ADMA eliminasyonu için önemli bir organdır. Alkolik hepatitli hastalarda plazma ADMA düzeylerindeki artışın, hepatik DDAH protein ekspresyonunun azalması ve hepatik PRMT-1 protein ekspresyonunun artması nedeniyle olduğu kaydedilmiştir (113).

2.8.6. Diabetes Mellitus ve İnsülin Rezistansı

Yapılan birçok çalışmada Tip I DM (6, 176), erken gestasyonel diyabet (110), insülinopeni (127, 226, 227) ve insülin direnci (29, 94, 164, 172) olan hastalarda dolaşımdaki ADMA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Tavşan renal

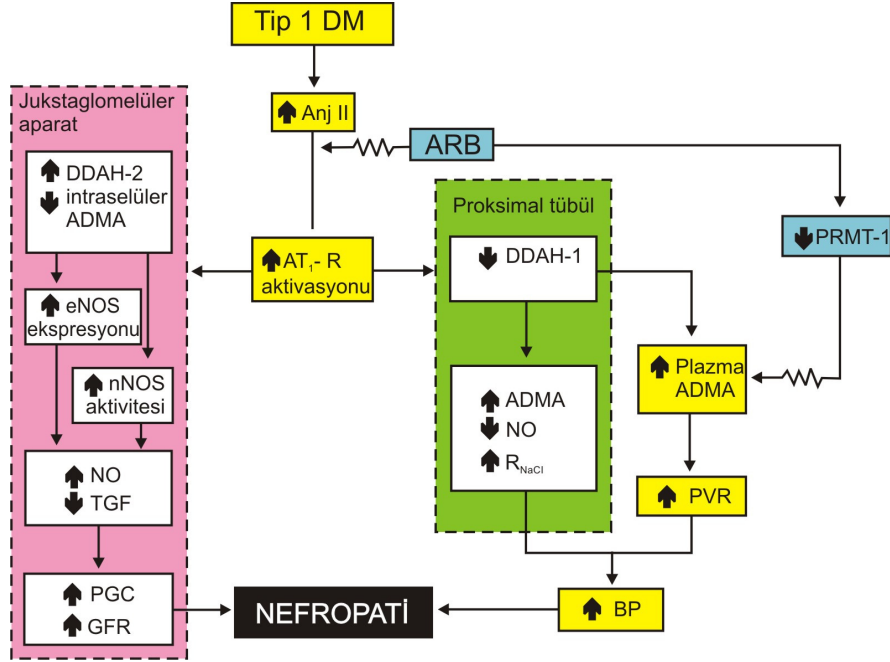
kortikal arter endotel hücrelerinde ADMA konsantrasyonu plazmadan 10 kat ve streptozosin-indüklü diabetes mellitusta ise 2-3 kat yüksek bulunmuştur (105). Diyabetik hastaların metformin ile tedavisi bu hastaların kan glukoz konsantrasyonlarını ve dolaşımdaki ADMA düzeylerini düşürmektedir (9). Yüksek yağ içeren diyetle ile beraber streptozosin verilmesi plazma ADMA düzeylerinin artmasına neden olmaktadır (94, 127, 130).

DM'ta ADMA'nın artış mekanizması birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (1, 94, 127, 130, 171, 226, 227). Hiperglisemi, diyabette endotel fonksiyonun bozulmasına neden olan TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri aktive edebilir (45, 167). Eid ve ark. (42), insan endotel hücre kültürlerinde TNF α 'nın DDAH aktivitesini azalttığını ve ADMA birikimine neden olduğunu kaydetmişlerdir. İnsülin veya adiponektin tarafından DDAH aktivitesi artırılarak ADMA birikimi engellenmektedir.

Normal sıçanlarda AT₁-R stimülasyonunun böbrekler üzerindeki doğrudan etkileri çalışılmış, Anj II ile inkübasyonun DDAH-1 ekspresyonunun AT₁-R bağımlı downregülasyonuna, DDAH-2 ekspresyonunun ise AT₁-R bağımlı upregülasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (127). Anj II üretimi veya AT₁-R üzerindeki etkilerindeki azalma jukstraglomeruler aparatta DDAH-2'nin ekspresyonunun azalmasına, bu da intraselüler ADMA düzeyinin artmasına neden olmaktadır. DDAH-2 eksprese eden hücrelerde ADMA artışı sonrası nNOS aktivasyonu inhibe olmaktadır. Yani ADMA birikimi nNOS-bağımlı glomeruler hiperfiltrasyonu inhibe etmektedir (7, 25, 82-85, 109, 180, 231).

Bu bulgular diabetes mellitusta gözlenen şiddetli endotel disfonksiyonu, mikrodamarların oksidatif stresi ve nNOS bağımlı glomeruler hiperfiltrasyona ışık tutmuştur (82, 83, 149, 150). Yapılan değişik çalışmalarda diyabetik sıçanların böbreğinde eNOS ekspresyonunun arttığı (32, 126, 169, 200), nNOS ekspresyonunun ise azaldığı (44), değişmediği (126) ve biraz arttığı (32, 73, 84, 155, 200) öne sürülmüştür. Diabetes mellitusta jukstraglomeruler aparatta DDAH-2' nin upregülasyonunun eNOS'u upregüle ettiği gözlenmiştir (207). Diyabetik sıçanlarda böbrek proksimal tübüllerinin DDAH-1 düzeyindeki azalma, renal ADMA atılımında bozulmaya

neden olur, bu da tuz sensitivitesinin ve hipertansiyonun gelişmesine öncülük eden ADMA düzeylerinin artmasına yol açmaktadır (143, 181). İnsülinopenik diabetes mellitusta NOS kan basıncının artmasına neden olarak kritik bir rol oynamaktadır (24) (Şekil 2.11).



Şekil.2.11. Diabetes Mellitus'ta DDAH enzimine bağımlı regülasyon

Hiperglisemi ile ilgili birçok mekanizma doğrudan veya dolaylı olarak DDAH aktivitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Anj II oksidatif stresi uyararak DDAH aktivitesinin post-transkripsiyonel inhibisyonuna öncülük etmektedir ve ROS üretimini teşvik eden proinflamatuvar sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, adezyon moleküllerinin ve transkripsiyon faktörü NF-kB' nin ekspresyonunu indüklemektedir (24, 26, 30, 45, 167). Endotel hücre kültürlerinde yüksek glukoz konsantrasyonlarının DDAH ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (160). Glikozile proteinlere maruz kalan sıçanlarda endotel disfonksiyonu ve DDAH aktivitesinin bozulduğu gözlenmiştir (42, 229). Yani diyabette endotel disfonksiyonun temelinde DDAH disfonksiyonu yatmaktadır.

2.9. DDAH Aktivitesi

2.9.1. DDAH Aktivite Ölçümleri

DDAH, ADMA ve L-NMMA'yı L-sitrüllin ve metilaminlere hidroliz etmektedir. DDAH aktivitesinin belirlenmesi, bu substratların yıkımı sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinin ölçümü prensibine dayanmaktadır (81, 94, 101). Dokular [¹⁴C]-ADMA veya [¹⁴C]-L-NMMA ile inkübe edildikten sonra katyonik ADMA veya L-NMMA sitrüllinden anyon değiştirici bir reğine ile ayrıştırılmaktadır. Reaksiyon ürünlerindeki [¹⁴C]-sitrüllin, metabolize olan [¹⁴C]-ADMA veya [¹⁴C]-L-NMMA miktarını vermektedir (102, 123). Bazı araştırıcılar, ADMA'yı işaretlemeyen ADMA ve sitrüllin ölçüm metotları geliştirmişlerdir: Örn; Nonaka ve ark. (119), ADMA'nın plazma ve renal dokuda belirlenebilmesi için hızlı ve hassas bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)-floresans deteksiyon yöntemi kurmuşlardır. Ayrıca, L-sitrüllinin diasetilmonoksim gibi oksimlerle reaksiyonu sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçüm prensibine dayanan daha basit kolorimetrik metotlar da bulunmaktadır (81). Bu yöntemin üre, proteine bağlı L-sitrüllin, ornitin karbamoil transferaz ve NOS tarafından DDAH'dan bağımsız yollarla üretilen L-sitrüllin ile verdiği interferansların önlenmesi gerekmektedir (81, 101, 173). Tain ve Baylis (173), HPLC ölçümleri ile uyumlu sonuç alınan, zaman almayan ve maliyeti düşük olan bir kolorimetrik yöntem geliştirmişlerdir.

[¹⁴C]-ADMA veya [¹⁴C]-L-NMMA'nın metabolizması prensibine dayanan DDAH aktivite ölçüm yöntemleri, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip oldukları için "altın standart" olarak kabul edilirler. Maas ve ark. deuterium işaretili ADMA'yı ([²H₆]-ADMA) substrat ve stable-izotop işaretili ADMA'yı ([¹³C₅ - ²H₆]-ADMA) internal standart olarak kullanarak 96 kuyucuklu plate'e uygulanabilir stabil-izotop temelli bir yöntem ile ADMA oluşumunu ve metabolizmasını belirlemeye çalışmışlardır. Bu yöntemi sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi kullanarak farelerin renal ve karaciğer dokularına uygulamışlardır. Bu yöntemin avantajı, dokudaki DDAH aktivitesinin ve endojen ADMA, SDMA ve L-Arjinin oluşumunun belirlenebilmesidir (101).

2.9.2. Nitrozilasyon

Sepsis sırasında gerçekleşen iNOS aktivasyonu, NO'dan nitrozat bileşiklerinin üretimine, bu da NOS izoenzimlerinin inaktivasyonuna neden olmaktadır (11). Leiper ve ark. (89), çok yüksek NO konsantrasyonlarında DDAH'ın inhibe olduğunu *in vivo* ve *in vitro* olarak bildirmişlerdir. Fakat DDAH'ın inaktive olması için gerekli NO konsantrasyonu tam olarak bilinmemektedir.

Sıçanların endotel hücreleri sitokinle muamele edilerek iNOS indüksiyonu yapılmış, NO'nun 6 kat arttığı durumlarda DDAH aktivitesinin inhibe olduğu gözlenmiştir.

Leiper ve ark. (89), DDAH ile reaksiyona girmeyen S-nitrozosistein kalıntılarını tanıyan spesifik bir antikor olduğunu bildirmişlerdir. DDAH özellikle sitozolde bulunan iNOS enziminin indüksiyonundan sonra S-nitrozile olmaktadır. PaDDAH'ın S-nitrozilasyonu, bir nitrojen monoksit grubunun aktif bölgede bulunan sistein 249 rezidüsünün tiyol yan zinciri ile kovalent bağ yapması ile gerçekleşmektedir. Memeli DDAH-1 enziminde NO'nun hedef bölgeleri sistein 221 ve 273 rezidüleridir (79, 89). Bazal koşullar altında DDAH, NOS tarafından sentezlenen NO ile S-nitrozile olamamaktadır. Ancak hücrelerde iNOS sitokinle indüklenirse üretilen NO miktarı yüksek düzeylerde olduğu için DDAH S-nitrozile olarak aktivitesini kaybetmektedir. Bu nitrozilasyon reaksiyonu kovalent olmasına rağmen indirgeyici bir ajan olan ditiyotreitol (DTT) varlığında bu engelleme geri dönüşümlüdür. DTT, sisteinin sülfidril gruplarını yerine koyarak DDAH aktivitesinin inhibisyonunu tersine çevirir (89, 167). Gow ve ark. (51), üç NOS izoenziminin her birinin sentezlediği NO'nun farklı hücrel proteinleri S-nitrozile ettiğini bildirmişlerdir. Bu izoenzime özgü nitrozilasyonun, hücrelerde NOS izoenzimlerinin farklı bölgelerde lokalizasyonlarının sonucu olduğu düşünülmektedir. Knipp ve ark. (79), NO'nun DDAH-1'in yapısı ve aktivitesi üzerine etkilerini incelemişler, sıkıca bağlı bir tane Zn^{+2} içeren (holo-form) DDAH-1'in S-nitrozilasyona dirençli, Zn^{+2} içermeyen formunun S-nitrozilasyona karşı dayanaksız olduğunu bulmuşlardır.

2.9.3. Tiyol Oksidasyonu

DDAH genlerinin transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenleyen birçok faktör tanımlanmıştır. Bunlara ek olarak, DDAH aktivitesi probukol (güçlü bir antioksidan) (67), taurin (antioksidan özelliklere sahip yarı esansiyel bir aminoasit) (174), insülin+adiponektin (42), pravastatin (kolesterol düşürücü ajan) (230), östradiol (59, 112), IL-1 β (191) ve fenofibrat veya pirolidin ditiyokarbamat (nükleer faktör- κ B antagonisti) (228) ile pozitif olarak düzenlenmektedir.

DDAH aktivitesi CF6 (175), lipopolisakkarit (225), glikozile sığır serum albumini (229), epoetin beta ve darbepoetin alfa gibi eritropoietin analogları (146), yüksek glukoz konsantrasyonları (160), okside LDL veya TNF- α (64), kolesterol veya homosistein (167) ve sitomegalovirüs enfeksiyonu (211) ile negatif yönde düzenlenmektedir. Bu bulguların hepsi endotel hücre ve düz kas hücre kültürlerinden elde edilmiştir.

DDAH'ın aktif bölgesinde bulunan sülfidril grubunun redoks modifikasyonu, enzimin oksidatif strese geri dönüşümlü hassasiyetine neden olmaktadır (78, 167). Örneğin homosistein, DDAH'ın sülfidril grubunu okside ederek enzimi inaktif hale getiren karışık disülfid oluşturmaktadır (167).

Suboptimal konsantrasyonlarda, L-Arjinin veya tetrahidrobiopterin (BH₄) varlığında ilk redüksiyon basamağından sonra elektronların eNOS (223) veya nNOS'a (138) akışı kesilmektedir. Bu koşullarda NOS, NO sentezinden çok süperoksit anyonu (O₂⁻) üretmeye yönelmektedir. O₂⁻ ile NO'nun etkileşimi ile peroksinitrit (ONOO⁻) oluşmaktadır. Bu reaksiyonda BH₄, BH₂'ye okside olmaktadır (213, 222, 224). DDAH'ın reaktif tiyoller ile oksidasyonu, aktivitesini yitirmesine bu da ADMA birikimine neden olmaktadır. ADMA konsantrasyonunun artması NOS'u inhibe ederek endotel hücrelerinde eNOS ile, lipopolisakkarit-indüklü pulmoner epitel hücrelerinde ise iNOS ile O₂⁻ oluşumuna öncülük etmektedir (19, 20, 213). Bu bulgulara göre, DDAH aktivitesinin redoks akışının bozulmasının, hücrel ADMA birikimine, ADMA'daki artışın NOS inhibisyonuna ve O₂⁻ oluşumuna neden olduğu görülmektedir.

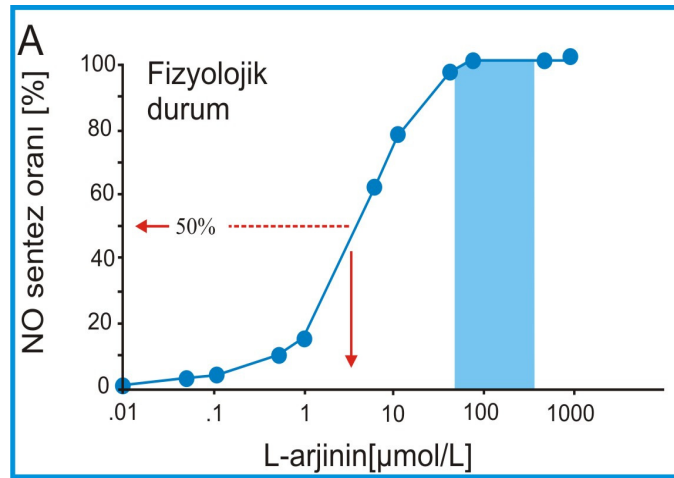
2.9.4. Arjinin ve Sitrüllinin Etkileri

Böbrek hastalığı, hiperkolesterolemi, oksidatif stres, inflamasyon, iskemi ve diyetel tuz kısıtlaması gibi durumlarda L-Arjinin NO üretimini uyardır (14, 19, 31, 66, 77).

Hepatik hücrelerde yapılan in vitro bir çalışmada L-Arjininin DDAH aktivitesinde doza bağımlı inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir. L-Arjinin DDAH'a bağlanmak için ADMA ile yarışmakta, bu da NO üretiminin kısıtlanmasına neden olmaktadır (209). Sitrüllininde DDAH'a bağlanmak için ADMA ile yarıştığı gözlenmiştir (102).

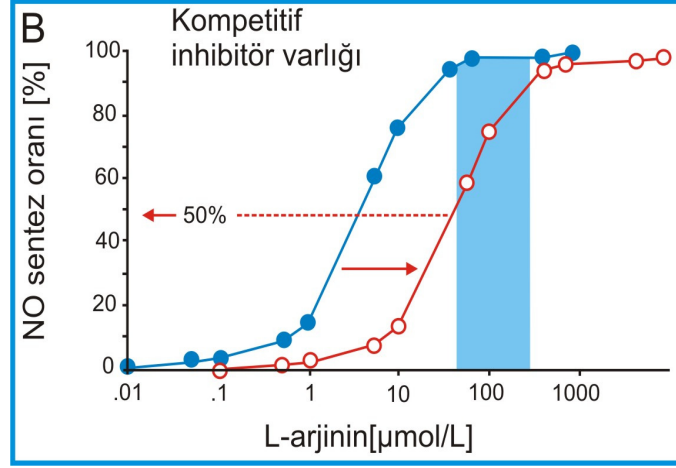
Plazma L-Arjinin düzeyleri NOS'un NO üretimi için gerekli Km'ini kat kat aştığı zaman NOS'un biyoaktivitesi sınırlanmaktadır. Bu olay arjinin paradoksu olarak isimlendirilmektedir (5, 39). Bu paradoks şöyle açıklanabilir: NOS, ADMA ile yarışmalı olarak inhibe edilmektedir, bu yüzden maksimal aktivite için yüksek substrat konsantrasyonları gerekmektedir. Sonuç olarak L-Arjinin/ADMA oranı NOS aktivitesi üzerinde bu maddelerin tek tek etkilerinden daha fazla anlam ifade etmektedir.

ADMA düzeyinin düşük olduğu ve L-Arjinin düzeylerinin normal aralıkta olduğu fizyolojik koşullarda eNOS enzim aktivitesi maksimumdur (Şekil.2.12).



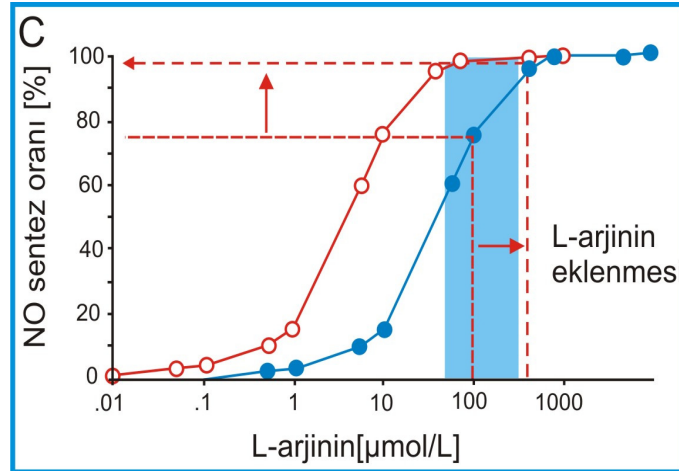
Şekil 2.12. Fizyolojik koşullarda eNOS enzim aktivitesi

NOS' un yarışmalı inhibitörü olan ADMA'nın düzeyi arttığında, L-Arjininin NO' ya dönüşümü bozularak NO sentezi azalmaktadır. Bu da Şekil.2.12' deki NO sentez eğrisinin sağa kaymasına neden olmaktadır (Şekil.2.13)



Şekil.2.13. ADMA' nın eNOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

Diyetsel destek sonucu L-Arjinin düzeyindeki küçük bir artışın bile NO sentez aktivitesinde belirgin bir artışa neden olduğu gözlenmiştir (Şekil.2.14).



Şekil.2.14. L-Arjinin desteği sonrası eNOS enzim aktivitesindeki değişimler

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Örnekler

DDAH enzim aktivitesi ölçüm yönteminin optimizasyonu için serum, idrar ve çeşitli doku örnekleri, enzimin saflaştırılmasında normal beslenen Wistar cinsi erişkin dişi-erkek sıçanların (ortalama vücut ağırlığı 250 g) böbrek dokuları kullanıldı.

3.2. Gerekli Cihaz ve Kimyasal Maddeler

3.2.1. Cihazlar

- Homojenizatör (Janke&Kunkel Ultra-Turrax T25, Almanya)
- UV-visible Spektrofotometre (GBC Cintra 303, Avustralya)
- Quartz küvet 1 mL (GB, Almanya)
- Su banyosu (Julabo TWB5, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Kottermann, Almanya)
- pH-metre (Mettler Toledo MP 220, İsviçre)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf 5043, Almanya)
- Soğutmasız santrifüj (NF1215, Nüve, Türkiye)
- Kolonlar (Sigma, A.B.D)
 - a. Luer-Lock Non-Jacketed (1.0 x 10)
 - b. Luer-Lock Non-Jacketed (1.0 x 20)
 - c. Luer-Lock Non-Jacketed (2.5 x 20)
 - d. Luer-Lock Non-Jacketed (2.5 x 30)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Cam pipetler
- Hassas terazi (Precisa, İsviçre)
- Biodialyser system, 50 ul (Sigma, A.B.D)
- Sterifil aseptic system and holder, 47 mm disc filter (Millipore, Fransa)
- Amicon Ultra-15 santrifüj tipi filtre (Millipore, Fransa)
- Diyaliz için selüloz membran (Sigma, A.B.D.)
- Distile su cihazı (Millipore, Fransa)

- Elektroforez tankı (Biolab, A.B.D)
- Gaz kromatografisi-Kütle spektrofotometresi (GC-MS, Thermo, A.B.D)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

- Sitrüllin (Sigma, A.B.D)
- N^G,N^G-Dimethylarginine dihydrochloride (ADMA) (Sigma, A.B.D)
- N^G,N^G-Dimethylarginine di(phydroxyazobenzene-p'-sulfonate) salt (SDMA) (Sigma, A.B.D)
- Amonyum sülfat (Merck, Almanya)
- Sükroz (Merck, Almanya)
- 2-Merkaptoetanol (Sigma, A.B.D)
- 5-Sülfosalisilik Asit (Merck, Almanya)
- CNBr-activated Sepharose 4B (Sigma, A.B.D)
- Phenyl-Sepharose CL-4B (Sigma, A.B.D)
- Sephacryl 200 HR (Sigma, A.B.D)
- QAE-Sephadex (Sigma, A.B.D)
- Üreaz (Sigma, A.B.D)
- Antipirin (Sigma, A.B.D)
- Diasetilmonoksim (Sigma, A.B.D)
- Trikloroasetik asit (Merck, Almanya)
- Folin-Ciocalteau (Sigma, A.B.D)
- Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄.2H₂O) (Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (Merck, Almanya)
- Sodyum karbonat (Na₂CO₃) (Merck, Almanya)
- Bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O) (Merck, Almanya)
- Bovine serum albumin (BSA) (Immucor)
- Sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇+2H₂O) (Merck, Almanya)
- N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) (Merck, Almanya)
- Trihidroksimetilaminometan (Tris) (Merck, Almanya)
- Brom timol mavisi (Merck, Almanya)

- Akrlamid (Merck, Almanya)
- N,N'-metilen bisakrlamid (Merck, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Aseton (Merck, Almanya)
- Etanol (Merck, Almanya)
- Coomassie brillant blue R-250 (Merck, Almanya)
- İzopropanol (Merck, Almanya)
- Asetik asit (Merck, Almanya)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, Almanya)
- Amonyum persülfat (Merck, Almanya)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1.1. Enzim Safılaştırımda Kullanılan Çözeltiler

- **Sükroz çözeltisi (0.25 M):** 86 g. Sükroz tartılarak 1 litreye distile su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti içerisine 100 µL 2-merkaptotanol ilave edildi.
- **Amonyum sülfat:** Homojenat miktarına göre amonyum sülfat tablosundan hesaplanarak ortama katı olarak ilave edildi.
- **Na₂HPO₄ çözeltisi (0.1 M):** 28,4 g Na₂HPO₄ tartılarak 2 litreye distile su ile tamamlandı.
- **NaH₂PO₄ çözeltisi (0.1 M):** 31,2 g. NaH₂PO₄.2H₂O tartılarak 2 litreye distile su ile tamamlandı.
- **Sodyum fosfat tamponu (0.1 M pH= 7.0) (A Tamponu):** 390 mL 0.1 M Na₂HPO₄ çözeltisinden, 610 mL 0.1 M NaH₂PO₄.2H₂O çözeltisinden alınarak üzerine 1L distile su eklendi.
- **Sodyum fosfat tamponu (0.1 M pH= 7.5):** 160 mL 0.1 M Na₂HPO₄ çözeltisinden, 840 mL 0.1 M NaH₂PO₄.2H₂O çözeltisinden alınarak üzerine 1L distile su eklendi.
- **Sodyum fosfat tamponu (0.01 M pH= 7.5) (B Tamponu):** 0.1 M pH= 7.5 olan sodyum fosfat tamponundan 1/10 dilüsyonla hazırlandı.

- **Sodyum fosfat tamponu (0.01 M pH= 7.0) (C Tamponu):** 0.1 M pH= 7.0 olan sodyum fosfat tamponundan 1/10 dilüsyonla hazırlandı.
- **Sodyum fosfat tamponu (0.05 M pH= 7.0):** 0.1 M pH= 7.0 olan sodyum fosfat tamponundan 1/20 dilüsyonla hazırlandı.

3.3.1.2. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **Sodyum fosfat tamponu (0.1 M pH= 6.5):** 685 mL 0.1 M Na₂HPO₄ çözeltisinden, 315 mL NaH₂PO₄.2H₂O çözeltisinden alınarak üzerine 1L distile su eklendi.
- **Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi (0.02 N):** 830 µL %37' lik HCl' den alındı, 500 mL' ye distile su ile tamamlandı.
- **Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi (%10):** 10 g TCA tartılarak 100 mL' ye distile su ile tamamlandı.
- **5-sülfosalisilik asit (%4):** 4 g 5-sülfosalisilik asit tartılarak 100 mL' ye distile su ile tamamlandı.
- **Üreaz çözeltisi (200 U/mL):** 5 U/mg üreaz enziminden 40 mg tartılarak 1 mL 0.1 M pH= 6.5 sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü.
- **Sitrülin standartı (1000 µmol/L) (1. Stok):** 17,52 g sitrülin 100 mL 0.02 N HCl içerisinde çözüldü.
- **Sitrülin standartı (100 µmol/L) (2. Stok):** 1. stoktan 1:10 dilüsyonla hazırlandı.
- **Diasetil monoksim çözeltisi (%0.8) (1. çözelti):** 0,8 g diasetil monoksim (DAMO) 100 mL %5 (v/v) asetik asit içerisinde çözüldü. Koyu renkli şişede +4 °C' de saklandı.
- **Antipirin çözeltisi (%0.9) (2. çözelti):** 0,9 g antipirin tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü.
- **Asit-ferrik çözelti (3. çözelti):** 5 mg FeCl₃ bir miktar distile suda çözümlenerek üzerine %95.5' lik H₂SO₄' ten 32.5 mL eklendi. Distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.
- **Kromojenik çözelti:** 1., 2. ve 3. çözeltilerden 75/15/10 (v/v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı.

- **Asimetrik dimetilarjinin (ADMA, 1 mM):** 27,5 mg ADMA tartılarak 100 mL 0.1 M pH= 6.5 sodyum fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

3.3.1.3. Enzimin Kinetik Özellikleri ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

- **0.1 M asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması:** 100'er mL'lik üç behere alındı 1,36 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tartılarak konuldu ve 80 ml distile suda çözüldü. pH metre yardımıyla 0,1 M'lık CH_3COOH kullanılarak pH'ları yine sırayla 3.0, 3.5 ve 4.0'e ayarlandı ve toplam hacimleri distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- **0.1 M Fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması:** 100'er mL'lik altı adet behere 1,42 g Na_2HPO_4 tartılarak konuldu ve 80 ml distile suda çözüldü. pH metre yardımıyla 0,1 M'lık H_3PO_4 kullanılarak pH'ları yine sırayla 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5'e ayarlandı ve toplam hacimleri distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- **0.2 M Tris-0.1 M HCl tampon çözeltilerinin hazırlanması:** 100'er mL'lik üç adet behere sırasıyla 2,423 g Tris tartılarak konuldu ve 80 ml distile suda çözüldü. pH metre yardımıyla 0.1 M'lık HCl kullanılarak pH'ları yine sırayla 8.0, 8.5 ve 9.0'a ayarlandı ve beherlerin toplam hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.1.4. Protein Miktarının Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Protein tayini için Lowry ve ark. (95) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bunun için A, B ve C çözeltileri hazırlandı.

- **Çözelti A:** Bu çözelti 20 g Na_2CO_3 , 0.1 M NaOH içinde çözümlenerek NaOH ile son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.

- **Çözelti B:** 0,5 g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözümlenerek son hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

- **Çözelti C:** 50 ml A çözeltisi ile 1 ml B çözeltisi karıştırılarak günlük olarak hazırlandı.

- **Folin-Ciocalteu çözeltisi:** Distile su ile 1/2 oranında seyreltilerek hazırlandı.

- **Standart protein çözeltisi:** %30' luk sığır albumininden 0.1 mL alınıp % 0.9' luk NaCl çözeltisi ile 50 mL' ye tamamlandı. 600 µg/mL konsantrasyonda standart elde edildi. Bu standarttan seri dilüsyonla 500, 400, 300, 200, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonda standartlar hazırlandı.

3.3.1.5. Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS - PAGE) İçin Kullanılan Çözeltiler

- **Tris-HCl (1 M, pH=8.8):** 12,1 g Tris 80 ml suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 8.8'e ayarlanarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- **Tris-HCl (1 M, pH=6.8):** 2,4 g Tris 5 ml suda çözülüp 1 M HCl ile pH' 6.8'e ayarlanarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

- **Akrilamid (%30) - bisakrilamid çözeltisi (%0,8):** 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid tartılarak 13,84 ml distile suda çözüldü.

- **SDS çözeltisi (%10):** 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml distile suda çözüldü.

- **Numune tamponu:** 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8), 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Kullanılmadan hemen önce bu tampona 500 µl β-merkaptoetanol ilave edildi.

- **Yürütme tamponu:** 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml distile suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

- **Jel Boyama çözeltisi:** 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL distile su içerisinde 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

- **Jel Yıkama çözeltisi:** 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.

- **Sabitleştirme çözeltisi:** %50 izopropanol, %10 TCA, %40 distile su olacak şekilde hazırlandı.

- **TEMED çözeltisi (%5):** 5 g TEMED tartılarak distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

- **Amonyum persülfat (PER) çözeltisi (%1,5):** 1,5 g amonyum persülfat tartılarak distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.

• **Ayırma jeli:** 15 mL 1M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin), 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat çözeltileri ve 11,94 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.

• **Yığıma jeli:** 1,24 mL 1M pH=6,8 Tris-HCl, 1mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,1 mL %1'lik SDS, 0,1 mL %5'lik TEMED, 0,2 mL %1,5'lik amonyum persülfat çözeltileri ve 7,36 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.

3.3.1.6. Jel Filtrasyon Kromatografisi İçin Kullanılan Çözeltiler

• **Sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH = 7.0, 0.1 M NaCl içeren):** 390 mL 0.1 M Na₂HPO₄ çözeltilisinden, 610 mL 0.1 M NaH₂PO₄.2H₂O çözeltilisinden alınarak üzerine 1L distile su eklendi ve 5,85 g NaCl tartılarak bu tampon içerisinde çözüldü.

3.3.2. Örneklerin Sağlanması

Sıçan böbreği, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlandı. Erişkin Wistar cinsi sıçanlar eter ile uyutulduktan sonra böbrekleri çıkarılıp tartılarak buz içerisindeki 2 mM 2-merkaptetanol içeren soğuk sodyum fosfat tamponu (0.1 M pH= 6.5) içerisine konuldu.

3.3.3. Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Kantitatif ölçümü

DDAH enzim aktivitesinin ölçümü, DDAH' ın ADMA' yı parçalayarak sitrüllin oluşturması prensibine göre yapıldı. Knipp ve Vasak' ın (81) kurmuş olduğu spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek enzim aktivitesi saptandı. Bir DDAH enzim ünitesi, 37 °C sıcaklıkta 1 dakika sürede ADMA' dan 1 µmol sitrüllin oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.3.3.1. Standart Eğri Çizimi

100 µmol/L konsantrasyonda hazırlanan stok sitrüllin standartından seri dilüsyonla 0, 5, 10, 20 ve 50 µmol/L konsantrasyonlarda standartlar

hazırlandı. 100 µL standart üzerine 100 µL üreaz (200 U/mL) eklenerek 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Bu karışımdan 100 µL alınarak üzerine 400 µL 1 mM konsantrasyonda ADMA çözeltisinden eklendi. 37 °C'de 45 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için ortama 500 µL %4' lük 5-sülfosalisilik çözeltisinden ilave edildi. +4 °C'de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatandan 200 µL alınarak üzerine 600 µL kromojenik çözeltiden eklendi. 60 °C'de su banyosunda 110 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Tüpler buz içerisine alınarak soğutuldu ve spektrofotometrede 466 nm' de distile su körüne karşı okunan absorbans değerleri kaydedildi.

3.3.3.2. DDAH Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi Geliştirmek İçin Yapılan Ön Analitik Çalışmalar

a. Deproteinizasyon Aşaması

DDAH enzim aktivitesi ölçümünden önce örnekleri proteinden arındırmak amacıyla yapıldı. 10 kişiden antikoagülansız tüpe alınan kan örnekleri 30 dakika koagülasyon için bekletilip 10 dakika 3000 g'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak "pool" yapıldı. Bu "pool" dan alınan porsiyonlar %10'luk Trikloroasetik asit ve %4'lük 5-sülfosalisilik asit kullanılarak deproteinize edildi. +4°C'de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanda sitrüllin miktarı ölçüldü. Her iki yöntemle yapılan deproteinizasyon sonucu elde edilen absorbans değerleri ve sitrüllin miktarları tablo halinde verildi.

b. Ürenin Ortamdan Uzaklaştırılması

Üre, sitrüllin gibi diasetilmonoksimle reaksiyona girebildiği için ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için ortama 0, 50, 100, 150 ve 200 U/mL konsantrasyonlarda üreaz eklenerek örneğin üre ölçümleri yapıldı. Bulgular grafik halinde verilerek üre miktarının sıfırlandığı üreaz konsantrasyonu belirlendi.

c. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Spektrofotometrik DDAH ölçüm yönteminin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Çalışmalar için deproteinizasyon için hazırlanan serum "pool" kullanıldı. Serum örnekleri aynı gün içinde (10 kez) ve arka arkaya her gün (10 gün) olmak üzere çalışılarak alınan absorbans değerleri kaydedildi. Yöntemin %CV (varyasyon katsayısı) değerleri hesaplandı.

d. Geri Elde Deneyleri

Sitrülin miktarı ölçülmüş serum örneği üzerine belli konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µmol/L) standart sitrülin çözeltilisinden eklendi ve alınan absorbans değerleri karşılaştırıldı.

3.3.3.3. Saflaştırılan Dokunun Başlangıç DDAH Aktivitesi Ölçümü

Wistar ırkı sıçanlardan (ortalama vücut ağırlığı 250 g) elde edilen taze böbrek örnekleri (15 g) üzerine 5 katı hacimde sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH= 6.5) ilave edilerek homojenize edildi. 100 µL doku homojenatı üzerine 100 µL 200 U/mL konsantrasyonda hazırlanan üreaz çözeltilisinden eklenerek 37°C' de su banyosunda 15 dakika inkübe edildi. 100 µL örneğe 400 µL 1 mM ADMA çözeltilisinden eklendi ve 37°C' de su banyosunda 45 dakika inkübe edildi. Örnek körüne ADMA ilavesi yapılmadı. 500 µL %4' lük 5-sülfosalisilik asit eklenmesi ile reaksiyon durduruldu ve 3000 g' de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 200 µL alınarak üzerine 600 µL kromojenik çözelti eklendi. 60°C' de su banyosunda karanlıkta 110 dakika inkübe edildi. Su banyosundan alınan örnekler buz içerisinde 10 dakika soğutuldu ve 466 nm' de spektrofotometrik analizler yapıldı. Çizilen standart eğriden ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplandı.

Bir DDAH enzim ünitesi, 37 °C sıcaklıkta 1 dakika sürede ADMA' dan 1 µmol sitrülin oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. Spesifik aktivite Ünite/mg protein olarak ifade edildi.

3.3.4. Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Böbrek Dokusundan Saflaştırılması

Tüm işlemler 0-4°C arasında gerçekleştirildi. Tampon çözeltiler içerisine koruyucu olarak son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 2-merkaptoetanol eklendi.

3.3.4.1. Homojenizasyon:

Wistar ırkı sıçanlardan elde edilen taze böbrek örnekleri (15 g) üzerine 135 mL sükröz çözeltisi (0.25 M) eklendi ve homojenize edildi. Ham homojenat +4°C' de 10000 rpm' de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı.

3.3.4.2. Amonyum Sülfatla Çöktürme:

DDAH enzim homojenatı üzerine sırayla %10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 saturasyonda olacak şekilde amonyum sülfat eklenerek süpernatanda enzim aktivite tayini yapıldı. Bu saturasyonları sağlamak için gerekli amonyum sülfat miktarı amonyum sülfat tablosu kullanılarak hesaplandı. Bütün bu işlemler +4°C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözünmüş olmasına dikkat edildi. DDAH enziminin %40-80 arasında çöktüğü gözlemlendi. Bu nedenle saflaştırma işlemine %40-80 aralığında çöktürme yapılarak devam edildi.

100 mL süpernatanda %40 amonyum sülfat saturasyonu elde etmek için gerekli amonyum sülfat miktarı 22.6 g olarak hesaplandı. Karışım manyetik karıştırıcı üzerinde 15 dakika bekletildikten sonra +4°C' de 1000 g' de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 10 mL 0.1 M pH= 7.0 sodyum fosfat tamponu (A tamponu) ilave edildi. Bu karışımın üzerine 0,27 g daha katı amonyum sülfat eklenerek %80 amonyum sülfat saturasyonu sağlandı. Karışım +4°C' de 10000 g' de 30 dakika santrifüj

edilerek süpernatant atıldı. Pellet üzerine 10 mL A tamponundan eklenerek +4°C’de 6 saat süreyle selüloz membran kullanılarak diyaliz edildi.

Diyaliz işlemi bittikten sonra diyalizatta enzim aktivitesi tayini ve Lowry metoduna göre protein tayini yapıldı.

3.3.4.3. Jel Filtrasyonu (Sephacryl S-200 Kromatografisi):

Sephacryl S-200 süspansiyonu üzerine 400 mL A tamponundan eklenerek +4°C’de bir gece bekletildi. Daha sonra Sephacryl S-200 jeli 2,5 x 30 cm çapındaki kolona hava kalmayacak şekilde dolduruldu. Kolonun yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponu ile alttan alınan elüatların pH’sı ve 280 nm’deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Diyaliz edilmiş enzim çözeltisi Sephacryl S-200 kolonuna yüklendi. Elüatlar 2 mL’lik fraksiyonlar halinde toplandı. Enzimin kolondan elüasyonu aynı tamponla gerçekleştirildi. Enzim aktivitesinin olduğu tüpler birleştirilerek Amikon ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edildi. Daha sonra elüatta enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçüldü.

3.3.4.4. İyon Değiştirici Kromatografi (QAE-Sephadex Kromatografisi):

15 g Sephadex A-50, 150 mL distile su içerisinde bir gece bekletilerek jelin şişmesi sağlandı. Daha sonra jel üzerindeki su atılarak üzerine 200 mL B tamponu eklendi. B tamponu ile dengelenmiş Sephadex A-50 2,5 x 20 cm çapındaki kolona dolduruldu. Bir önceki basamaktan elde edilen enzim çözeltisi bu kolona yüklendi. Adsorbe olmuş enzim 50 mL 0,02 M NaCl içeren B tamponu, daha sonra da 50 mL 0,2 M NaCl içeren B tamponu ile elüe edildi. 1 mL’lik fraksiyonlar halinde toplanan elüatların 280 nm’de absorbansları ölçülerek aktif fraksiyonlar bir araya getirildi ve ultrafiltrasyon tüpleri ile enzim çözeltisi konsantre edildi. Elüatta enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

3.3.4.5. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Phenyl-Sepharose Kromatografisi):

10 g Phenyl-Sepharose CL-4B soğuk suyla birkaç kez yıkandı. Daha sonra üzerine 100 mL B tamponu ilave edilerek +4°C'de 24 saat jelin şişmesi sağlandı. Üzerindeki tampon uzaklaştırıldıktan sonra yavaşça kolona aktarıldı. QAE-Sephadex kromatografisi ile elde edilen enzim çözeltisi 2 M amonyum sülfat içeren B tamponu ile dengelenmiş Phenyl-sepharose CL-4B kolonuna (1,0 X 20 cm) uygulandı. Kolondan önce 200 mL 2 M amonyum sülfat içeren B tamponu, daha sonra 200 mL 1 M amonyum sülfat içeren B tamponu geçirilerek 1 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Enzimin 1 M amonyum sülfat içeren B tamponu ile elüe edildiği gözlemlendi. Elüatlarda enzim aktivitesi tayin edildi. Aktif fraksiyonlar birleştirilerek +4°C' de 6 saat süreyle 0.01 M, pH = 7.0 sodyum fosfat tamponuna (C tamponu) karşı selüloz membran ile diyaliz edildi. Daha sonra diyalizatta enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçüldü.

3.3.4.6. Affinite kromatografisi (MMA -Sepharose kromatografisi):

10 g CNBr-activated Sepharose 4B üzerine 400 mL soğuk su eklenerek +4°C'de 10 dakika bekletildi. Üzerindeki su atılarak 6.5 nM konsantrasyonda hazırlanmış 500 mL L-MMA ilave edildi. Yavaşça karıştırılarak +4°C'de bir gece beklemeye bırakıldı. Bağlanmayan L-MMA' yı uzaklaştırmak için jel 1 litre soğuk sodyum fosfat tamponu (0.1 M, pH = 7.0) ile yıkandı. Hazırlanan jel 1.0 x 10 cm çapındaki kolona hava kalmayacak şekilde yavaşça aktarıldı. Kolon C tamponu ile dengelendikten sonra diyalizat, MMA- Sepharose 4B kolonuna uygulandı. Kolon 40 mL C tamponu ile yıkandıktan sonra, 100 mL 0,01 M pH= 7,0 sodyum fosfat tamponu ve 100 mL 0,05 M pH= 7,0 sodyum fosfat tamponu kolondan geçirilerek enzim elüsyonu gerçekleştirildi. 1 mL' lik fraksiyonlar halinde toplanan eluatların 280 nm' de absorbansları ölçüldü ve aktif fraksiyonlar ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edildi. Elde edilen enzim çözeltisinin enzim aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi.

3.3.5. Protein Miktarının Saptanması

3.3.5.1. Kalitatif Protein Miktarı Tayini

Safılaştırma işlemindeki tüm basamaklarda alınan bütün fraksiyonların kalitatif protein tayinleri yapıldı. Kalitatif protein tayininin esası, proteinlerin yapısında bulunan ve aromatik halkaya sahip triptofan, trozin ve fenilalanin amino asitlerinin 280 nm'de verdiği absorbandsın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Kuvartz küvetler kullanılarak spektrofotometre ile fraksiyonların absorbandsları distile su körüne karşı okundu.

3.3.5.2. Kantitatif Protein Miktarı Tayini

Her bir safılaştırma basamağında elde edilen enzim çözeltilisinin protein miktarları kantitatif olarak Lowry metodu ile belirlendi (95).

Standart Protein Eğrisinin Çizimi

7 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 600 µg/mL'lik stok protein standartından seri dilüsyonla son konsantrasyonu 500, 400, 300, 200, 100, 50 ve 0 µg/mL hazırlanan standartlardan 100 µL konuldu. Her tüpe 1 mL C çözeltilisinden ilave edildi. 15 dak oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1/2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltilisinden 100 µL eklendi. 30 dak oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbandsları 750 nm'de köre karşı okundu, bu değerler standartların konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi.

Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirildi.

3.3.5.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Safılaştırılan enzimin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak Andrews ve ark.'nın yöntemine göre belirlendi (7). Sephacryl S-200 süspansiyonu üzerine 400 mL A tamponundan eklenerek +4°C'de bir gece bekletildi. Şişirilen jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde yavaşça kolona aktararak 0.1 M pH = 7.0 sodyum fosfat tamponu ile dengelendi.

Kolonun dengelendiğini tespit etmek için üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH' sı ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi.

Sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin molekül ağırlığının tayininde kullanılacak standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler (Sığır serum albumini (66000 Da), Ovalbumin (45000 Da), Karbonik anhidraz (30000) ve Sitokrom c (12400 Da)) geçirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç mL elüsyon tamponu 0.1 M NaCl içeren sodyum fosfat tamponu (0.1 M pH=7.0) ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra saflaştırılan enzim Sephacryl S-200 kolonuna uygulandı. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 3'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. 280nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül ağırlığını belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve Log MA değerleri hesaplandı. Log MA- K_{av} grafiği çizilerek DDAH enziminin molekül ağırlığı belirlendi. K_{av} değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_0 = Void hacim

V_e = Elüsyon hacmi

V_t = Kolon yatak hacmi

3.3.5.4. SDS-PAGE Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü Ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması

DDAH enzimi saflaştırıldıktan sonra Laemmli' nin (88) kurduğu yönteme uygun olarak %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak saflaştırılan enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara (spacer) ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kısıkaçlarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle dolduruldu. Bu işlem sırasında ortamda hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 1 saat jelin katılaşması için beklendi. Katılaştıktan sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce distile su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Saflaştırılan enzim çözeltisi toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu ile karıştırılarak 5 dakika 65 °C'de inkübe edildi. Jel hazırlandıktan sonra standart proteinler ve saflaştırılan enzim jele tatbik edildi. Standart protein olarak Sığır serum albumini (66000 Da), Ovalbumin (45000 Da), Karbonik anhidraz (30000) ve Sitokrom c (12400 Da) kullanıldı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (Anot), üstten (-) kablo (Katot) yerleştirildi. 80 voltta yarım saat bekletildikten sonra akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında elektroforez yapıldı. Akım kesildikten sonra cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılarak sabitleştirme çözeltisinde 15 dakika bekletildi. Buradan alınan jel boyama çözeltisi içerisinde 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları

belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözeltide çalkalandı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MA- R_f standart grafikleri çizildi. Bu grafikten faydalanılarak DDAH enziminin molekül ağırlığı tespit edildi.

Proteinlerin R_f değerleri; $R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$ formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.3.6. DDAH Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

3.3.6.1. DDAH' in Optimum pH' sı

DDAH' in optimum pH' sını belirlemek için pH 3.0–9.0 aralığında çalışıldı. Saflaştırılan enzimin aktivitesi pH 3.0–4.5 arası için 0,1 M'lık asetat tamponu, pH 5–7.5 arası için 0,1 M'lık fosfat tamponu ve pH 8.0–9.0 için de 0,1 M'lık Tris/HCl tamponu kullanılarak ölçüldü. Bulgular grafik halinde verildi.

3.3.6.2. DDAH' in Optimum Sıcaklığının, Aktivasyon Enerjisinin (E_a), Aktivasyon Entalpisinin (ΔH) ve her 10 °C' deki Sıcaklıkla Artma Faktörünün (Q_{10}) Hesaplanması

Sıcaklığın saflaştırılan DDAH enziminin aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalar enzimin optimum pH'sında ve 0–80 °C aralığında çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, dijital su banyosu kullanılarak ayarlandı. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktarılarak enzimin optimum pH' sında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine (°K) çevrilerek $1/T \times 1000$ olarak ifade edildi. Sıcaklık değerlerine karşı çizilen log k grafiğinden Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak

$Eğim = -\frac{E_a}{R}$ formülünden aktivasyon enerjisi hesaplandı.

Aktivasyon entalpisinin (ΔH) hesaplanmasında ise $\Delta H = E_a - R \times T$ formülü kullanıldı.

Enzimin 10 °C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığını gösteren Q_{10} değeri ise $\log Q = \frac{10 \cdot E_a}{2.303 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2}$ formülü kullanılarak hesaplandı (İdeal gaz sabiti (R): 8.314 J/mol. °K).

3.3.6.3. DDAH' in Substrat Kinetiği

Saflaştırılan DDAH enziminin K_m ve V_{max} sabitlerini bulmak amacıyla 0, 0.5, 0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarda ADMA kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerler ile Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafikleri çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmada kullanılan enzim çözeltilisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim miktarı (E_T) bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri $k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$ formülü ve tepkimenin özgüllük sabiti

(V_0) ise $V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

3.3.6.4. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesinde meydana getirdiği değişimleri incelemek için ortama substrat ilavesinden önce son konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde bazı metal iyonları (Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2}) eklendi, örnekler enzimin optimum çalıştığı sıcaklık olan 37 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra DDAH enzim aktivite tayini yapıldı.

3.3.6.5. Enzimin Depolama Kararlılığı

DDAH enziminin 0.1 M pH= 6.5 sodyum fosfat tamponu ve % 30 gliserol içerisinde +4 °C, -20 °C ve -80 °C'de saklandığında 0., 3., 7. ve 15. gündeki aktiviteleri ölçülerek aktivitesindeki değişimler incelendi.

3.3.7. Enzimin Aminoasit Analizi

Safılaştırılan DDAH enzimini hidroliz etmek için enzim çözeltisinden 100 µL alınarak üzerine 200 µL 6 M HCl eklendi ve karışım +4 °C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Gaz kromatografisi-Kütle Spektrofotometresinde (GC-MS) aminoasit analizi yapıldı.

3.3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde ve grafiklendirilmesinde SPSS for Windows 15.0 (Chicago ,IL,USA) ve Microsoft Office 2003 paket programlarından yararlanıldı.

BULGULAR

Bu çalışma kapsamında; DDAH enzim aktivitesini ölçmek için hassas ve güvenilir bir spektrofotometrik yöntem kurulmuş, yöntem kurulmadan önce analitik ön çalışmalar (deproteinizasyon, ürenin yol açtığı interferansın elimine edilmesi, tekrarlanabilirlik çalışmaları) yapılmış, yöntemin çalışılacak örneğe uygunluğu test edilerek doğrulanmıştır. Daha sonra DDAH enzimi sıçan böbreğinden homojenizasyon, amonyum sülfatla çöktürme, Sephacryl S-200 jel filtrasyonu, QAE-Sephadex A-50 iyon değiştirici kromatografisi, Phenyl-Sepharose hidrofobik etkileşim kromatografisi ve MMA-Sepharose affinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmış ve kurulan yöntem ile her bir saflaştırma basamağındaki DDAH aktivitesi ölçülmüştür. Saflaştırma sonucu elde edilen enzimin optimum pH, optimum sıcaklığı, aktivasyon enerjisi, aktivasyon entalpisi, aktivite artma faktörü (Q_{10}) ile kinetik özellikleri (K_m , V_{max} , k_{cat} , V_0) belirlenmiş ve bazı metal iyonlarının enzim üzerine etkisi incelenmiştir.

4.1. Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Kantitatif ölçümü

DDAH enzim aktivitesinin ölçümü, ADMA' nın DDAH enzimi ile yıkılarak sitrüllin oluşması prensibine dayanmaktadır. DDAH enzimini saflaştırmaya başlamadan önce DDAH aktivitesini ölçmede kullanılacak yöntemin optimizasyonu için literatür verileri göz önüne alınarak bazı analitik ön çalışmalar (deproteinizasyon, ürenin ortamdan uzaklaştırılması, tekrarlanabilirlik ve geri elde çalışmaları) yapılmıştır.

4.1.1. DDAH Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemini Geliştirmek İçin Yapılan Analitik Ön Çalışmalar

a. Deproteinizasyon Aşaması

10 serum örneğinde % 10'luk trikloroasetik asit (TCA) ve %4'lük 5-sülfosalisilik asit (SSA) ile yapılan deproteinizasyon sonucu elde edilen absorbans değerleri ve ölçülen sitrüllin konsantrasyonları Ort \pm SD olarak

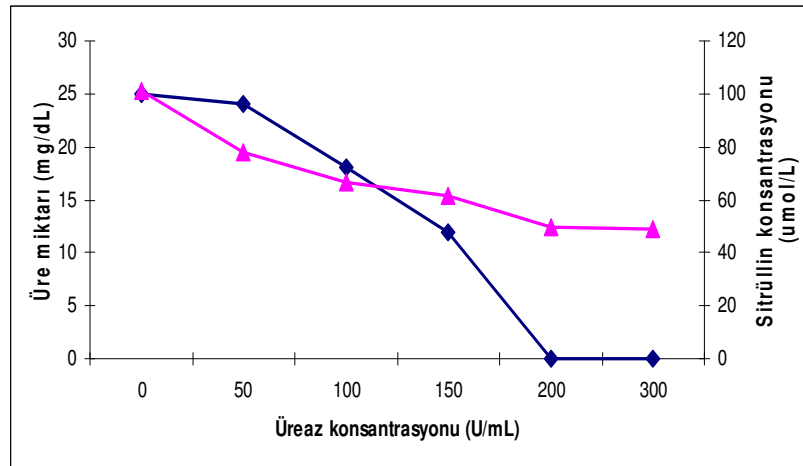
Tablo.4.1' de gösterilmiştir. Bu çalışmada TCA ile deproteinizasyonda süpernatanın bulanık olduğu, SSA ile yapıldığında süpernatanın daha berrak olduğu gözlenmiştir. Bu bulanıklığın ölçüm sonuçlarını etkileyeceği düşünüldüğünden DDAH enzim aktivitesi ölçümünde proteinden arındırma işlemine %4' lük 5-sülfosalisilik ile devam edilmiştir.

Tablo.4.1. Deproteinizasyon sonucu alınan absorbans değerleri

	Absorbans (466 nm)	Sitrülin konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$)
%10 TCA	0.341 \pm 0,08	93,94 \pm 0,11
%4 SSA	0.226 \pm 0,03	61,09 \pm 0,17

b. Ürenin Ortamdan Uzaklaştırılması

Deney ortamına 0, 50, 100, 150, 200 ve 300 U/mL konsantrasyonlarda hazırlanmış üreaz enzim çözeltisinden eklenerek örneğin üre ve sitrülin miktarı ölçülmüş, sonuçlar Şekil.4.1' de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre ürenin ortamdan tamamen uzaklaştırıldığı üreaz konsantrasyonunun 200 U/mL olduğu saptanmıştır. Bu yüzden DDAH enzim aktivitesi ölçümüne 200 U/mL konsantrasyonda hazırlanan üreaz enzimi ile devam edilmiştir.



Şekil.4.1. Üreaz konsantrasyonunun ortamdaki üre (■) ve sitrülin konsantrasyonu (▲) üzerine etkisi

c. Gün İçi (intraassay) ve Günler Arası (interassay) Tekrarlanabilirlik

Gün içi tekrarlanabilirlik için 'serum pool' hazırlanarak aynı gün içerisinde toplam 10 kez sitrüllin miktarı ölçülmüştür. Günler arası tekrarlanabilirlik için ise hazırlanan 'serum pool' den 0,5 mL' lik porsiyonlar ayrılarak -80 °C' de çalışma zamanına kadar saklanmıştır. 10 gün boyunca her gün bir porsiyon serum örneği -80 °C' den çıkarılarak sitrüllin miktarı ölçülmüştür. Kullandığımız yöntemin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları ve değişkenlik katsayıları (% CV) değerleri Tablo.4.2' de gösterilmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik için % CV 1.6, günler arası tekrarlanabilirlik için % CV 2.9 olarak bulunmuştur.

Tablo.4.2. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Gün İçi Tekrarlanabilirlik			Günler Arası Tekrarlanabilirlik		
Ölçüm no	Sitrüllin (µmol/L)	% CV	Gün	Sitrüllin (µmol/L)	% CV
1	61,09	1.6	1.gün	61,09	2.9
2	60,08		2.gün	61,46	
3	61,21		3.gün	62,23	
4	62,18		4.gün	59,78	
5	59,98		5.gün	60,32	
6	60,03		6.gün	58,78	
7	61,34		7.gün	57,65	
8	62,7		8.gün	62,45	
9	60,5		9.gün	63,01	
10	60,24		10.gün	59,24	
Ort ± SD	60,94 ± 0,95		Ort ± SD	60,6 ± 1,75	

d. Geri Elde (Recovery) Deneyleri

Deney ortamındaki sitrüllin miktarını doğru ölçüp ölçmediğimizi kontrol etmek için sitrüllin konsantrasyonu bilinen serum örneği üzerine belli konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 µmol/L) standart sitrüllin

çözültisinden eklenmiş ve bu örneklerde yeniden sitrüllin ölçümü yapılmıştır. Bu sonuçlara ait veriler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Sitrüllin ölçümü için geri elde sonuçları

Eklene konsantrasyon (µmol/L)	Ölçülen konsantrasyon (µmol/L)	Geri elde konsantrasyonu (µmol/L)	% Geri elde
0	61,09	-	100
5	65,87	4,78	99,6
10	72,1	11,01	101,4
25	85,76	24,67	99,6
50	110,05	48,96	99,1
100	148,98	87,89	92,4

4.1.2. Saflaştırılan Dokunun Başlangıç DDAH Aktivitesi Ölçümü

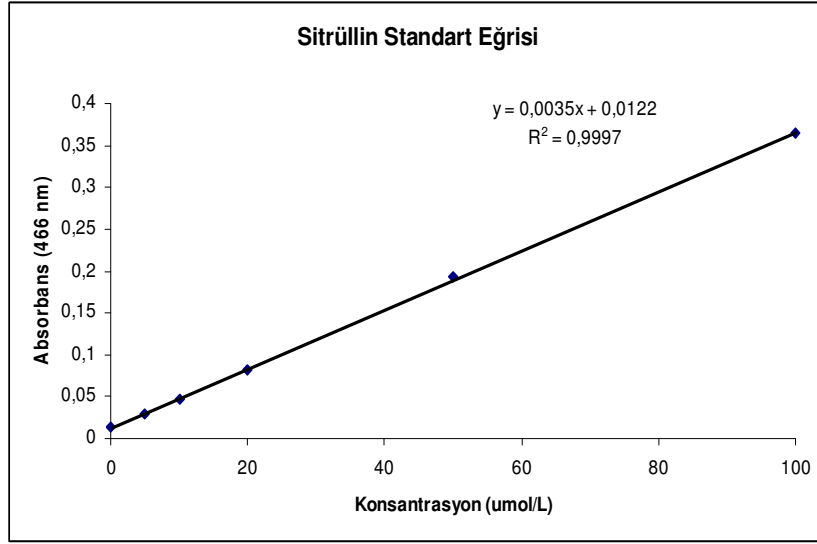
DDAH enzim aktivitesinin ölçümü, ADMA' nın DDAH enzimi ile yıkılarak sitrüllin oluşması prensibine dayanmaktadır. DDAH enziminin saflaştırmaya başlamadan önce bazal DDAH aktivitesini ölçmek için yöntem uyarlaması yapılmış, bu yöntem kullanılarak başlangıçta ve her bir saflaştırma basamağında DDAH enzim aktivitesi belirlenmiştir.

4.1.2.1. Standart Sitrüllin Eğrisinin Çizimi (DDAH Aktivite Ölçümü)

0, 5, 10, 20, 50 ve 100 µmol/L konsantrasyonlarda hazırlanan sitrüllin standartları ile kurmuş olduğumuz yöntem kullanılarak çizilen standart kalibrasyon eğrisi Şekil.4.2' de gösterilmiştir.

Çizilen standart eğriden ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen sitrüllin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

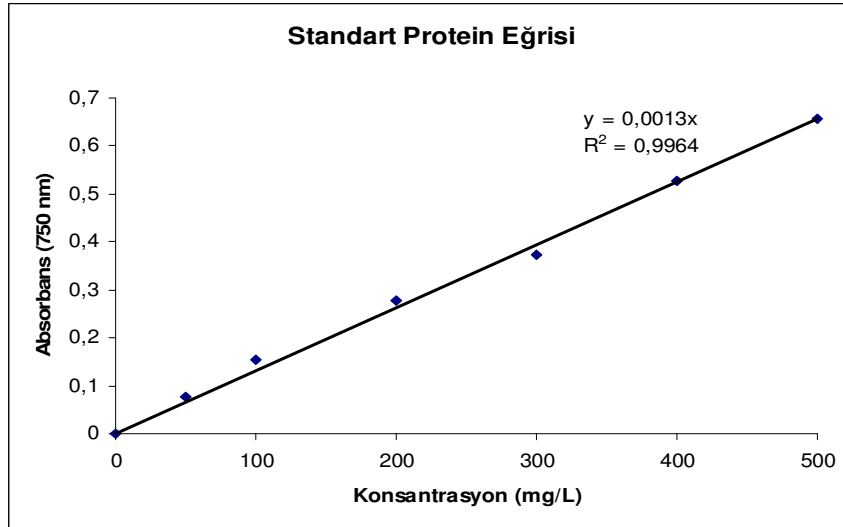
Bir DDAH enzim ünitesi, 37 °C sıcaklıkta 1 dakika sürede ADMA' dan 1 µmol sitrüllin oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmış, spesifik aktivite Ünite/mg protein olarak ifade edilmiştir.



Şekil.4.2. Sitrülin Standart Kalibrasyon Eğrisi

4.1.2.2. Standart Protein Eğrisinin Çizimi

0, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hazırlanan protein standartları ile Lowry yöntemi kullanılarak Şekil.4.3' te gösterilen standart eğri çizilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

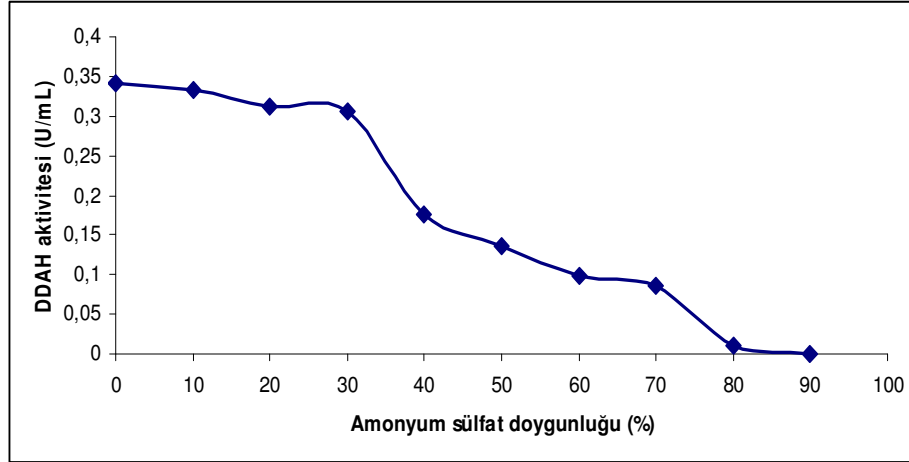


Şekil.4.3. Protein standart kalibrasyon eğrisi

4.2. Dimetilarginin Dimetilaminohidrolaz (DDAH) Enziminin Böbrek Dokusundan Saflaştırılması

4.2.1. Saflaştırma Basamakları

Gereç ve Yöntem bölümü 3.3.4.1' de belirtilen şekilde böbrek örnekleri homojenize edilmiş, ardından +4 °C'de 10000 rpm' de 30 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlar amonyum sülfatla çöktürme işlemine tabi tutulmuştur. Amonyum sülfatla çöktürme metodunda öncelikle enzimin hangi doygunlukta tamamen çöktüğünü (salting out) bulmak için % 10-90 aralığında yüzde değer onar onar artırılarak enzimin çökmesi sağlanmış ve süzöntüdeki aktivite miktarına bakılmıştır. Şekil.4.4' de amonyum sülfat ilavesinden sonra süpernatanda çökmeden kalan enzimin aktivitesi gösterilmiştir. DDAH enziminin % 40 ve 80 amonyum sülfat aralığında tamamen çöktüğü gözlenmiştir.

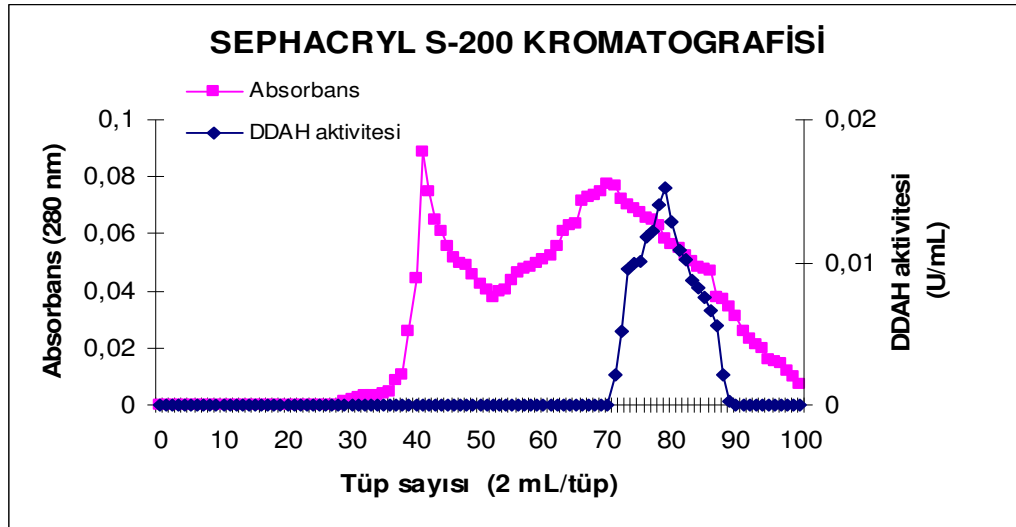


Şekil.4.4. Amonyum sülfat ilavesinden sonra süpernatanda çökmeden kalan enzimin aktivitesi

Homojenattan (100 mL) aktivite ve protein miktarının belirlenmesi için örnek alındıktan sonra % 40 ve 80 oranında amonyum sülfat ile doyurularak çöktürme ile ortamdaki proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Homojenat amonyum sülfat ilavesinden sonra 15 dakika süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu süre sonunda +4 °C'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj

edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatanın enzim aktivitesine bakılarak enzimin tamamen çöktürülüp çöktürülmediği anlaşılmıştır. Çöktürme sonucunda elde edilen çökelek az miktarda tampon çözelti (0.1 M, pH = 7.0 Sodyum fosfat tamponu) ile çözülerek protein yönünden oldukça yoğun bir karışım elde edilmiştir. Bu karışım, içerisinde amonyum sülfat bulundurma olasılığına karşılık 1 gece süreyle +4°C'de buzdolabında kendi hacminin 10 katı kadar sodyum fosfat tamponuna karşı diyalize tabii tutulmuştur. Diyaliz işleminde 10 kDa cut off selüloz membran diyaliz torbası kullanılmıştır.

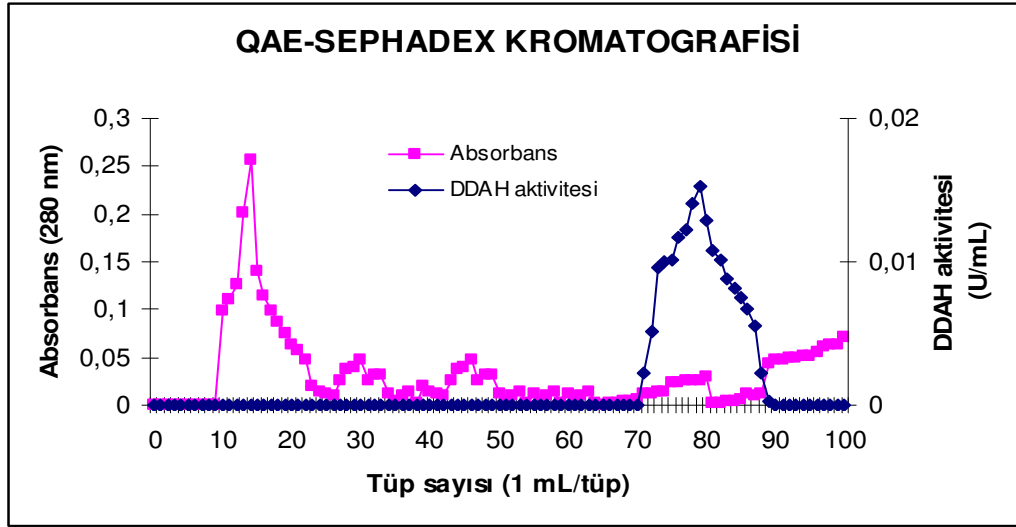
Diyaliz edilen protein çözeltisi daha sonra Sephacryl S-200 ile doldurulmuş kolona yüklenmiştir. DDAH enzimi bu kolondan 0.1 M pH = 7.0 sodyum fosfat tamponu ile elüe edilmiştir. 100 tüpe 2 mL' lik fraksiyonlar toplanmıştır. Sephacryl S-200 kolonundan alınan her bir tüpte protein miktarı ve enzim aktivitesi ölçülmüş, sonuçlar şekil.4.5'te gösterilmiştir. Enzim aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar bir araya toplanarak saflaştırma işlemine devam edilmiştir.



Şekil.4.5. Sephacryl S-200 kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm dalga boyundaki absorbanslarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği

Kolon boyu : 2.5 x 30 cm
Dengeleme tamponu : 0.1 M, pH = 7.0 sodyum fosfat tamponu
Elüsyon tamponu : 0.1 M, pH = 7.0 sodyum fosfat tamponu

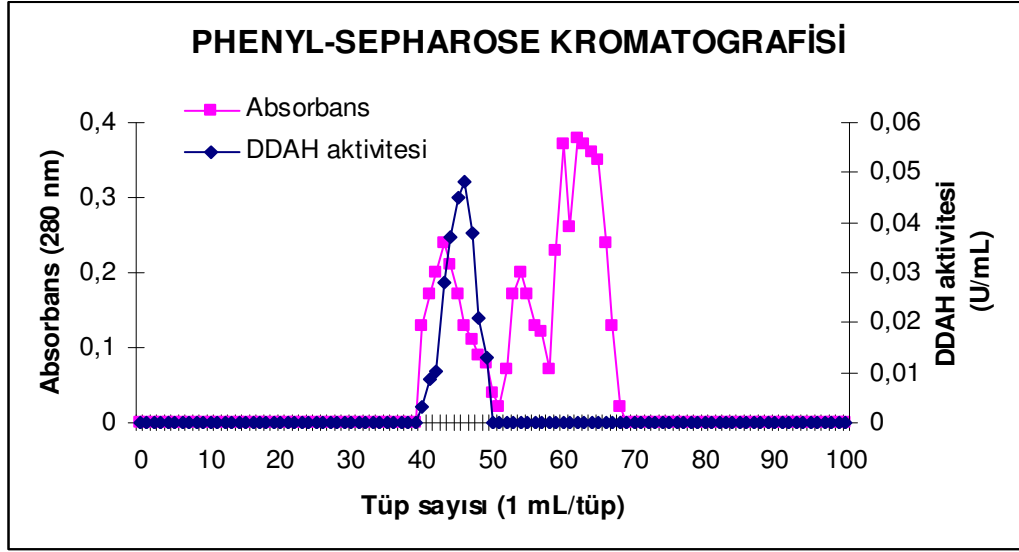
Sephacryl S-200 kolonundan alınan yüksek aktivite gösteren enzim çözeltisi QAE-Sephadex A-50 kolonuna yüklenmiştir. DDAH enzimi bu kolondan 0.02-0.2 M NaCl içeren 0.01 M, pH = 7.5 sodyum fosfat tamponu ile elüe edilmiştir. QAE-Sephadex A-50 kolonundan alınan fraksiyonlarda ölçülen enzim aktiviteleri ile 280 nm'de verdiği absorbands değerleri grafikte sunulmuştur (Şekil.4.6).



Şekil.4.6. QA-SEPHADEX A-50 kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm' deki absorbandslarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği

Kolon boyu : 2.5 x 20 cm
Dengeleme tamponu : 0.01 M, pH = 7.5 sodyum fosfat tamponu
Elüsyon tamponu : 0.02-0.2 M NaCl içeren 0.01 M, pH = 7.5 sodyum fosfat tamponu

QA-SEPHADEX A-50 kolonundan elüe edilen enzim çözeltisi ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre edilmiş, daha sonra Phenyl-Sepharose CL-4B kolonuna uygulanmıştır. Bu kolondan 0-2 M amonyum sülfat içeren 0.01 M pH = 7.5 sodyum fosfat tamponu ile toplanan fraksiyonların 280 nm' de okunan absorbands değerlerine karşı çizilen enzim aktivite grafiği Şekil.4.7' de sunulmuştur.



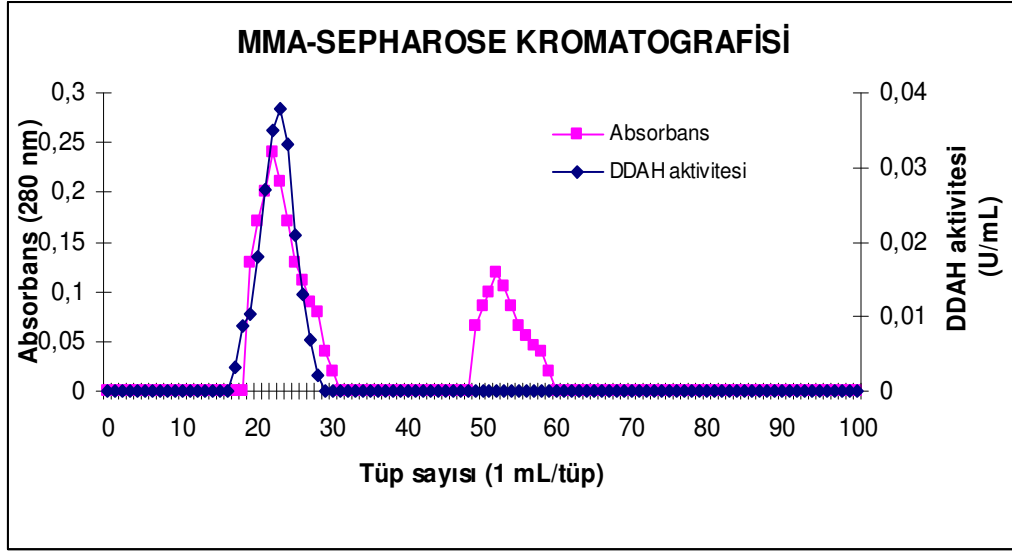
Şekil.4.7. Phenyl-Sepharose CL-4B kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm' deki absorbanslarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği

Kolon boyu : 1.0 x 20 cm

Dengeleme tamponu : 0.01 M, pH = 7.5 sodyum fosfat tamponu (2 M amonyum sülfat içeren)

Elüsyon tamponu : 0.01 M, pH = 7.5 sodyum fosfat tamponu (1 M amonyum sülfat içeren)

Phenyl-Sepharose CL-4B kolonundan alınan enzim aktivitesi yüksek olan tüpler birleştirilerek MMA-Sepharose kolonuna yüklenmiştir. Kolondan 0.01-0.05 M pH = 7.0 sodyum fosfat tamponu geçirilerek toplanan fraksiyonların 280 nm' de okunan absorbans değerlerine karşı çizilen enzim aktivite grafiği Şekil.4.8' da sunulmuştur.



Şekil.4.8. MMA-Sepharose kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm' deki absorbanslarına karşı çizilen DDAH enzim aktivite grafiği

Kolon boyu : 1.0 x 10 cm
Dengeleme tamponu : 0.01 M, pH = 7.0 sodyum fosfat tamponu
Elüsyon tamponu : 0.01-0.05 M, pH=7.0 sodyum fosfat tamponu

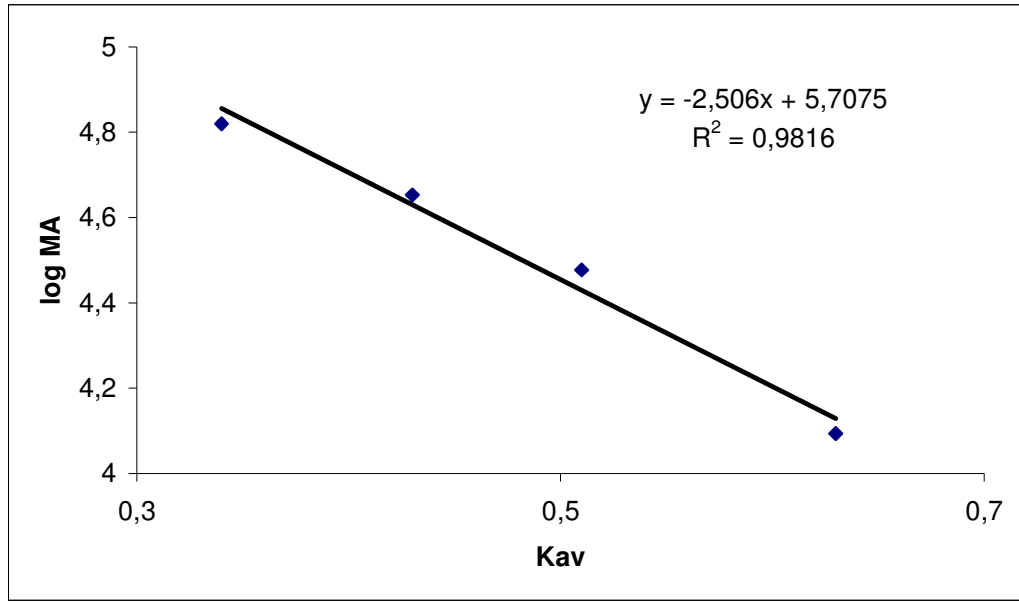
Her bir saflaştırma basamağındaki çözeltinin hacmi ölçülmüş, protein miktarı ve enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Tüm bu işlemler sonucunda DDAH enzimi sıçan böbreğinden %28 verimle 712.4 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları ve bu basamaklardan elde edilen veriler Tablo.4.4'te gösterilmiştir.

Tablo. 4.4. DDAH enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Toplam protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	100	1287	0.0047	0.470	0.365×10^{-3}	100	1.0
Amonyum sülfat (%40)	15	538	0.028	0.413	0.767×10^{-3}	88	2.1
Amonyum sülfat (%80)	12	532	0.034	0.408	0.803×10^{-3}	87	2.2
Sephacryl S-200	24	139	0.015	0.366	2.628×10^{-3}	78	7.2
QAE-Sephadex	25	11.2	0.011	0.287	25.66×10^{-3}	61	70.3
Phenyl-Sepharose	5.4	1.09	0.037	0.202	185.35×10^{-3}	43	507.8
MMA-Sepharose	4.5	0.51	0.029	0.132	260.03×10^{-3}	28	712.4

4.2.2. Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin Gereç ve Yöntem bölümü 3.3.5.3' te anlatıldığı şekilde Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi yapılmıştır. Sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin molekül ağırlığının tayininde kullanılacak standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler (Sığır serum albumini (66000 Da), Ovalbumin (45000 Da), Karbonik anhidraz (30000) ve Sitokrom c (12400 Da)) geçirilmiş, daha sonra Kav değerleri hesaplanarak log MA-K_{av} grafiği çizilmiştir (Şekil.4.9). Standart proteinlerin ve DDAH enziminin molekül ağırlıkları ve K_{av} değerleri Tablo.4.5'te gösterilmiştir.



Şekil.4.9. DDAH enziminin molekül ağırlığını belirlemek için yapılan jel filtrasyonu sonucu elde edilen standart grafik

Bu grafikten faydalanılarak DDAH enziminin molekül ağırlığı 35870 olarak belirlenmiştir.

Tablo.4.5. Standart proteinlerin ve DDAH enziminin molekül ağırlıkları ve Kav değerleri

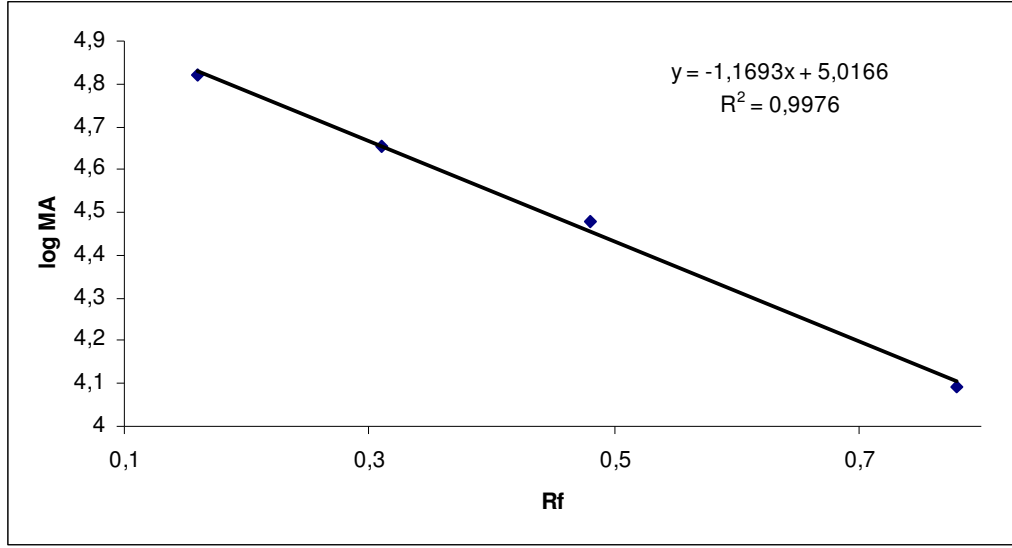
	Molekül Ağırlığı (Da)	K_{av} değeri
Sığır serum albumini	66000	0,34
Ovalbumin	45000	0,43
Karbonik anhidraz	30000	0,51
Sitokrom c	12400	0,63
DDAH	35870	0,46

4.2.3. SDS-PAGE Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü Ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması

Saflaştırılan DDAH enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE elektrofrezisi yapılmıştır. DDAH enzimi ile beraber standart proteinlerde (Sığır serum albumini (66000 Da), Ovalbumin (45000 Da), Karbonik anhidraz (30000) ve Sitokrom c (12400 Da)) elektrofrez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekilmiştir (Şekil.4.10) ve log MA-Rf grafiği çizilerek sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin molekül ağırlığı bu grafikten hesaplanmıştır (Şekil.4.11). Standart proteinlerin ve DDAH enziminin Molekül ağırlıkları ve göç hızları Tablo.4.6' da gösterilmiştir.



Şekil.4.10. DDAH enzimine ait SDS-PAGE elektrofrez sonuçları (1. Standart proteinler, 2. Saflaştırılan DDAH enzimi)



Şekil.4.11. SDS-PAGE jel elektroforezinde standart olarak kullanılan sığır serum albumini, ovalbumin, karbonik anhidraz ve sitokrom c'nin molekül ağırlıklarının logaritmasına karşı göç hızları (Rf).

Tablo.4.6. Standart proteinlerin ve DDAH enziminin göç hızları ve moleküler ağırlıkları

	Molekül Ağırlığı (Da)	Log MA	Rf
Sığır serum albumini	66000	4,82	0,16
Ovalbumin	45000	4,65	0,31
Karbonik anhidraz	30000	4,48	0,48
Sitokrom c	12400	4,09	0,78
DDAH	33560	4,53	0,42

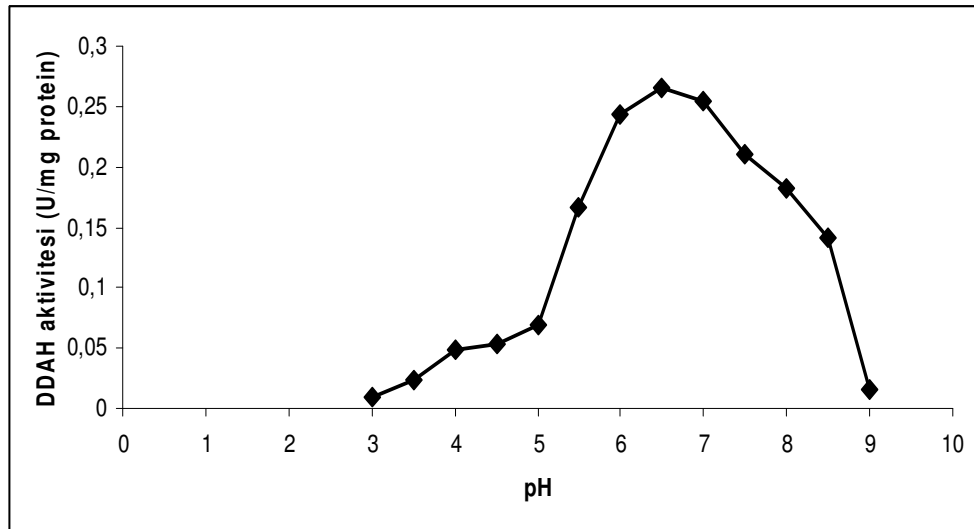
4.3. DDAH Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

4.3.1. Optimum pH' nın Saptanması

Safılaştırılan DDAH enziminin pH = 3.0 - 9.0 aralığında hazırlanmış tamponlar kullanılarak aktivitesi ölçülmüş, en fazla aktivite gösterdiği pH (optimum pH) 6.5 olarak belirlenmiştir (Tablo.4.7 ve Şekil.4.12).

Tablo.4.7. DDAH enziminin farklı pH'larda ölçülen aktivite değerleri

pH	DDAH aktivitesi (U/mg protein)
3	0,009
3,5	0,023
4	0,048
4,5	0,053
5	0,069
5,5	0,167
6	0,244
6,5	0,266
7	0,254
7,5	0,211
8	0,182
8,5	0,141
9	0,016



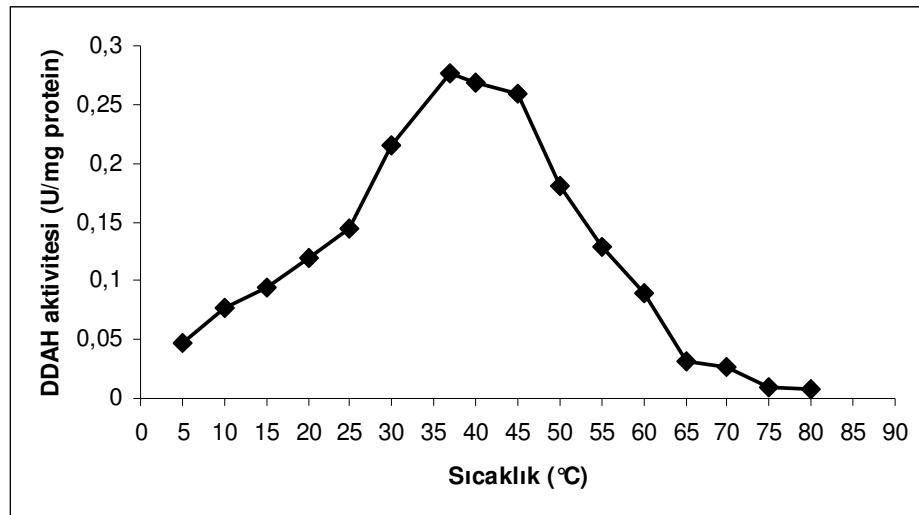
Şekil.4.12. DDAH enzimi için optimum pH grafiği

4.3.2. DDAH' nin Optimum Sıcaklığının Saptanması

Safılaştırılan DDAH enziminin optimum pH'sında ve 0–80 °C aralığında aktivitesi ölçülmüş ve enzimin optimum sıcaklığının 37 °C olduğu gözlenmiştir (Tablo.4.8 ve Şekil.4.13).

Tablo.4.8. DDAH enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivite değerleri

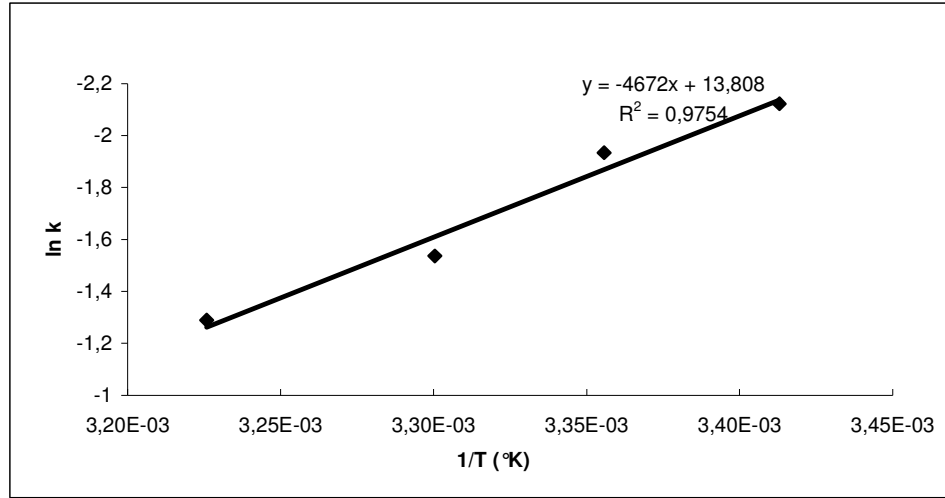
Sıcaklık (°C)	DDAH aktivitesi (U/mg protein)
5	0,048
10	0,076
15	0,094
20	0,120
25	0,145
30	0,215
37	0,276
40	0,268
45	0,259
50	0,181
55	0,129
60	0,090
65	0,031
70	0,026
75	0,009
80	0,008



Şekil.4.13. DDAH enzimi için optimum sıcaklık grafiği

4.3.3. DDAH' in Aktivasyon Enerjisinin (E_a), Aktivasyon Entalpisinin (ΔH) ve her 10 °C' deki sıcaklıkla aktivite artma faktörünün (Q_{10}) Hesaplanması

293-310 °K sıcaklık aralığında ölçülen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak Arrhenius grafiği ($\ln k-1/T$) çizilmiştir (Şekil.4.14). Bu grafikten elde edilen doğrunun eğimi kullanılarak bu sıcaklık aralığında DDAH enziminin aktivasyon enerjisi (E_a) 38845 J/mol (38,845 kJ/mol), aktivasyon entalpisini (ısısı) ise $\Delta H = E_a - R \times T$ formülünden 38703 J/mol (38,703 kJ/mol) olarak hesaplanmıştır. 303-313 °K aralığındaki Q_{10} değeri ise 1.63 olarak bulunmuştur.



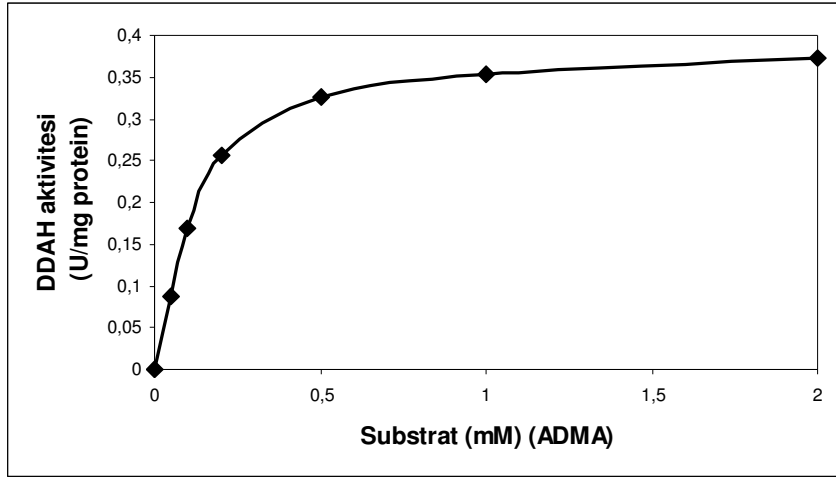
Şekil. 4.14. DDAH enzimi için Arrhenius grafiği

4.3.4. DDAH' in Michaelis-Menten Katsayısı (K_m), Maksimum Hızı (V_{max}), Turnover Sayısı (K_{cat}) Ve Özgüllük Sabiti (V_0) Değerlerinin Belirlenmesi

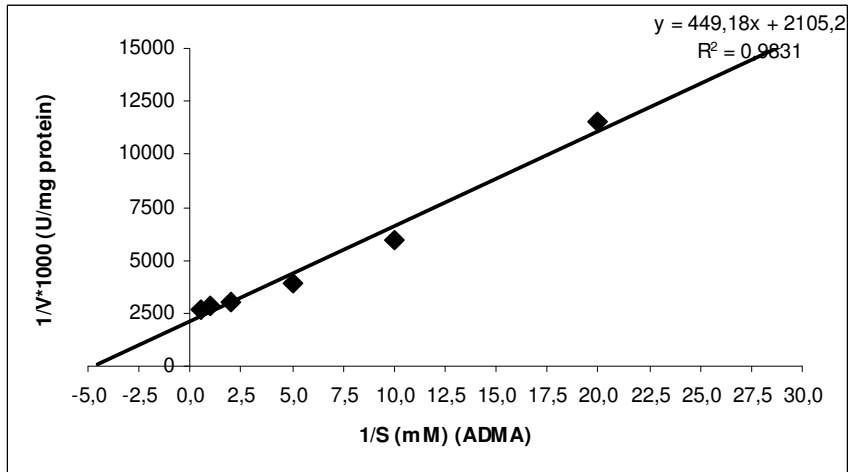
DDAH enziminin 6 farklı substrat (ADMA) konsantrasyonunda aktivitesi ölçülmüş ve bu ölçüme ait veriler Tablo.4.9'da sunulmuştur. Bu değerler kullanılarak Michaelis-Menten (Şekil.4.15) ve Lineweaver-Burk (Şekil.4.16) grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler kullanılarak enzimin K_m , V_{max} , K_{cat} ve V_0 değerleri hesaplanmıştır.

Tablo.4.9. DDAH enzimi için farklı substrat konsantrasyonlarında ölçülen aktivite değerleri

[S] (mM)	V (U/mg protein)	1/[S] (mM) ⁻¹	1/V (U/mg protein) ⁻¹
0,05	0,087	20,00	11494,25
0,1	0,168	10,00	5952,38
0,2	0,256	5,00	3906,25
0,5	0,387	2,00	2583,98
1	0,453	1,00	2207,51
2	0,473	0,50	2114,17



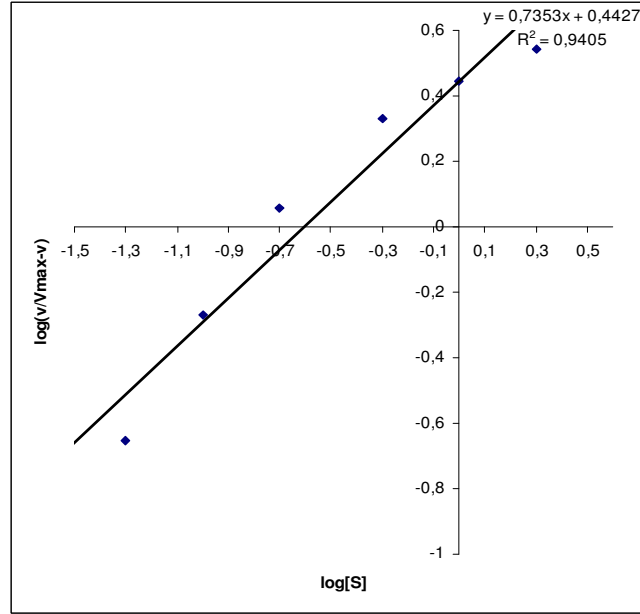
Şekil.4.15. DDAH enzimi için Michaelis-Menten grafiği



Şekil.4.16. DDAH enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.16' da görüldüğü gibi elde edilen doğru 1/V eksenini 2105.2 değerinde, 1/[S] eksenini -4.686 değerinde kesmektedir. Bu değerlerden DDAH enzimi için $V_{max} = 0.48$ U/mg protein ve $K_m = 0.21$ mM ADMA olarak belirlenmiştir. Daha sonra bulunan K_m ve V_{max} değerleri kullanılarak enzimin ADMA substratı için $k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$ formülünden turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri 0.165 s^{-1} ve $V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}$ formülünden enzimin özgüllük sabiti değeri V_0 ise $855 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Tablo.4.10' da DDAH enziminin bulunan kinetik sabitleri gösterilmiştir.

DDAH enziminin substratı (ADMA) ile kooperativite gösterip göstermediğini anlamak için Hill grafiklemesi yapıldığında Hill sabiti (h) = 0.74 olarak bulunmuştur. Hill sabiti 1.00'den küçük olduğu için enzimin substratı ile negatif kooperativite gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil.4.17).



Şekil.4.17. DDAH enziminin ADMA substratı için Hill grafiklemesi

Tablo.4.10. DDAH enziminin kinetik sabitleri

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	k_{cat} (s^{-1})	V_0 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
ADMA	0.21	0.48	0.165	786

4.3.5. DDAH Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Saflaştırılan enzim bazı metal iyonları ile muamele edilerek enzim aktivitesi ölçülmüş, bu ölçüme ait veriler Tablo.4.11’de sunulmuştur.

Tablo.4.11. Bazı metal iyonlarının DDAH enzim aktivitesi üzerine etkisi

Eklene metal iyonu (0.1 mM)	Enzim aktivitesi (% kalan)
Civa	3,2
Kadmiyum	0,2
Bakır	0,1
Çinko	34
Demir	88
Magnezyum	97

4.3.6. Depolama Kararlılığının Araştırılması

Enzimin 0.1 M, pH = 6.5 sodyum fosfat tamponu ve % 30 gliserol içinde, + 4 °C, -20 °C ve -80 °C’ de 15 güne kadarki aktivite değişimleri incelenmiştir. Bu ölçümler sonucu elde edilen % kalan aktiviteler Tablo.4.12’ de verilmiştir.

Tablo.4.12. DDAH enziminin depolama kararlılığı ile ilgili bulgular

		Fosfat tamponu			%30 Gliserol			DDAH aktivitesi (% kalan)
		+4 °C	-20 °C	-80 °C	+4 °C	-20 °C	-80 °C	
Gün	0	100	100	100	100	100	100	
	3	78,2	90,1	95,3	93,5	95,3	101,4	
	7	51,3	66,7	78,4	87,6	93,2	98,4	
	15	3,4	48,3	62,3	76,2	91,8	99,2	

+4 °C’de, pH=6,5 sodyum fosfat tamponunda bekletilen enzim 15 gün sonra aktivitesinin tamamını kaybederken, +4 °C’de % 30 gliserolde bekletilen enzimin 15 gün sonra başlangıç aktivitesinin, %76,2’ sini koruduğu gözlenmiştir. Enzim -20 °C’ de % 30 gliserol içinde bekletildiğinde 15 gün

sonra başlangıç aktivitesinin % 91,8' ini, -80 °C' de %30 gliserol içinde bekletildiğinde ise başlangıç aktivitesinin %99,2' sini korumuştur.

4.3.7. DDAH Enziminin Aminoasit Analizi Sonuçları

Hidroliz edilen enzimin GC-MS ile yapılan aminoasit analiz sonuçları Tablo.4.13' te gösterilmiştir.

Tablo.4.13. DDAH enziminin aminoasit kompozisyonu

Aminoasitler	µmol/L	%
Alanin	876	8,43
Glisin	406	3,91
α-Aminobütirik Asit	10	0,10
Valin	579	5,57
Lösin	1329	12,79
İzolösin	676	6,51
Treonin	425	4,09
Serin	122	1,17
Prolin	209	2,01
Aspartat	581	5,59
Metiyonin	156	1,50
4-Hidroksiprolin	18	0,17
Glutamat	890	8,56
Fenil Alanin	793	7,63
Glutamin	657	6,32
Ornitin	390	3,75
Glisin-Prolin (dipeptid)	825	7,94
Lizin	746	7,18
Histidin	227	2,18
Hidroksilizin	141	1,36
Tirozin	86	0,83
Prolin-Hidroksiprolin (dipeptid)	47	0,45
Triptofan	202	1,94

TARTIŞMA

Tüm memeli hücrelerinde bulunan Dimetilarjinin dimetilaminohidrolaz (DDAH; EC 3.5.3.18) enziminin farklı doku dağılımları gösteren DDAH-1 ve DDAH-2 olmak üzere iki izoenzimi mevcuttur. Bu enzim, özellikle ADMA ve NMMA gibi metil arjininleri yıkıma uğratar, reaksiyon sonucu sitrüllin ve metilaminler oluşur. Tüm vücut sıvılarında ve birçok dokuda serbest olarak oluşan ADMA ve NMMA, nitrik oksit sentazı inhibe ederler. Bu yüzden, DDAH NO sentezini inhibe eden protein degradasyonu sonucu oluşan metilarjininlerin ortamdaki uzaklaştırılmasında önemli fonksiyona sahiptir. DDAH enzimi NOS aktivitesini düzenleyen metillenmiş L-arjininlerin hidrolizini sağlayan Zn^{+2} içeren monomerik (31.2 kDa) bir enzimdir. DDAH aktivitesinin inhibisyonu metilarjininlerin birikmesine neden olur, bu da NO sentezini bloke eder ve vazokonstriksiyona neden olur. DDAH aktivitesinde bozulma olduğunda plazma ADMA düzeylerinde artış gözlenir. Kardiyovasküler hastalık veya hiperkolesterolemi, DM ve insulin rezistansı gibi kardiyovasküler risk faktörlerini taşıyan insanlarda gözlenen vasküler relaksasyondaki bozulma bu nedendir. Oksidatif stres DDAH aktivitesinin bozulmasına, bu da ADMA birikimine neden olmaktadır. DDAH enziminin oksidatif strese hassasiyeti, aktif bölgesindeki sülfidril grubu nedeniyledir. Homosistein düzeyleri yüksek olduğu zaman homosistein DDAH enzimine atak yaparak disülfid bağı oluşturur, bu da enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olur. Homosistein ve diğer kardiyovasküler risk faktörleri DDAH'ın sülfidril grubunu oksitleyerek, ADMA birikimine ve bunun sonucu olarak ta NOS aktivitesinin azalmasına neden olurlar. Enzimin NO metabolizmasındaki öneminden dolayı enzim üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış, böbrek, karaciğer, beyin gibi birçok dokudan ve mikroorganizmadan saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada DDAH enziminin sıçan böbreğinden saflaştırılması, kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı ağır metal iyonlarının bu enzim üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle GATA Deney Hayvanları Laboratuvarından sıçan böbrekleri alınarak soğuk zincir kuralına

uygun olarak laboratuvarımıza getirilmiştir. Enzimin saflaştırılması işlemi altı basamakta gerçekleştirilmiştir:

- 1) Homojenizasyon
- 2) Amonyum sülfatla çöktürme
- 3) Sephacryl S-200 jel filtrasyonu
- 4) QAE-Sephadex A-50 iyon değiştirici kromatografisi
- 5) Phenyl-Sepharose hidrofobik etkileşim kromatografisi
- 6) MMA-Sepharose affinite kromatografisi

Tüm bu işlemler sonrasında DDAH enzimi sıçan böbreğinden %28 verim ve $260,03 \times 10^{-3}$ U/mg protein' lik bir spesifik aktivite ile saflaştırılmıştır (Tablo.4.4).

Bütün saflaştırma işlemleri +4 C' de yapılarak sıcak ortamın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiştir. Ayrıca tüm saflaştırma basamaklarında tiyol oksidasyonunu önlemek için 1 mM 2-merkaptoetanol kullanılmıştır.

Çalışmamızda DDAH enzimi, Wistar cinsi sıçanlardan elde edilen 10 adet taze sıçan böbrek örneği kullanılarak saflaştırılmıştır. DDAH enzimini saflaştırmak için jel filtrasyon kromatografisi uygulamadan önce, bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Aktivite tayininde substrat olarak ADMA kullanılmış ve amonyum sülfat çöktürme aralığı %40-80 bulunmuştur. Başlangıç protein miktarının yaklaşık %58.6'sı uzaklaştırılmıştır. Enzim örneği, bu basamak ile hem 2.2 kez saflaştırılmış (Tablo 4.4), hem de jel filtrasyon kromatografisi için gerekli en uygun hacim olan 12 mL'ye konsantre edilmiştir.

Çalışmamızda saflaştırma yönteminin ikinci basamağı olarak Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi seçilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde, kullanılan örneğin hacmi oldukça önemlidir. İlk kromatografi basamağı olarak jel filtrasyonu kullanılmasının en önemli avantajının molekül ağırlığı yüksek olan proteinlerin büyük oranda uzaklaştırılması olduğu düşünülmektedir. Bu basamakta saflaştırma oranı

başlangıç basamağına göre, DDAH aktivitesi için 7.2 olarak saptanmıştır (Tablo 4.4).

Çalışmamızda daha sonra, jel filtrasyonu basamağında elue edilen 24 mL'lik aktif fraksiyonlar QAE-Sephadex A-50 kolonuna uygulanmıştır. Bağlı proteinler QAE-Sephadex A-50 kolonundan 0.2-0.02 M NaCl gradienti oluşturularak elue edilmiştir. Bu basamakta enzim 70.3 kez saflaştırılmıştır (Tablo 4.4). QAE-Sephadex A-50 kolonundan elue edilen 25 mL'lik aktif fraksiyonlar Phenyl-Sepharose hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonuna uygulanmıştır. Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak olan biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile matriksteki apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. 2 M gibi yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda tekrarlayıcı yıkama basamakları ile istenmeyen proteinler jelden ayrıştırılmıştır. Bu basamakta saflaşma, başlangıç basamağına göre 507.8 kat olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Saflaştırmanın son basamağında MMA-Sepharose affinite kromatografisi yapılarak sıçan böbreği DDAH enzimi 712.4 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 260.03×10^{-3} U/mg protein olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Ogawa ve ark. (123) amonyum sülfatla çöktürme, Sephacryl S-200 jel filtrasyonu, QAE-Sephadex A-50 iyon değiştirici kromatografisi, Phenyl-Sepharose hidrofobik etkileşim kromatografisi ve MMA-Sepharose affinite kromatografisi yöntemlerini kullanarak DDAH enzimini 100 adet sıçan böbreğinden %31 verimle 830 kat saflaştırmışlar ve spesifik aktiviteyi 0.254 U/mg olarak bulmuşlardır. Kimoto ve ark. (76) ise amonyum sülfatla çöktürme, Sephacryl S-200 jel filtrasyonu, QAE-Sephadex A-50 iyon değiştirici kromatografisi, Phenyl-Sepharose hidrofobik etkileşim kromatografisi ve PBE 94-jel kolonu kullanarak DDAH enziminin insan karaciğerinden 1800 kat saflaştırmışlardır.

Knipp ve ark. (79) Amonyum sülfat presipitasyonu, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow hidrofobik etkileşim kromatografisi, Source 15Q anyon değiştirici kromatografi, L-Arg-Sepharose affinite kromatografisi ve Superdex 75 Size exclusion kromatografisi kullanarak DDAH enzimini sığır beyninden yaklaşık

1150 kat saflaştırmışlardır. Literatürde sıçan böbreğinden DDAH enzimini saflaştırılmasına yönelik tek veri Ogawa ve ark.'nın yayınlarıdır ve bizim ulaştığımız saflaştırma oranı ile yaklaşık bir değer elde etmişlerdir.

Wistar cinsi sıçanların böbrek dokularından elde edilen homojenat ve her saflaştırma basamağındaki enzim çözeltisinde protein miktarları Lowry yöntemiyle Şekil 4.3'te verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlenmiştir. Bu yöntem, az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (5 mg/mL) sebebiyle avantajlı bir yöntemdir.

Kalitatif protein tayininde kolondan elüe edilen enzim çözeltilerinin 280 nm'de absorbanslarına bakılmıştır. Bu yöntem proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de ışığı maksimum absorblamaları esasına dayanmaktadır.

DDAH enzim aktivitesinin ölçümü, DDAH' ın ADMA' yı parçalayarak sitrüllin oluşturması prensibine göre yapılmıştır. Knipp ve Vasak' ın (81) kurmuş olduğu spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek enzim aktivitesi saptanmıştır. DDAH enzimini saflaştırmaya başlamadan önce DDAH aktivitesini ölçmede kullanılacak yöntemin optimizasyonu için literatür verileri göz önüne alınarak bazı analitik ön çalışmalar (deproteinizasyon, ürenin ortamdan uzaklaştırılması, tekrarlanabilirlik ve geri elde çalışmaları) yapılmıştır. DDAH enzim aktivitesini ölçmeden önce örnekler TCA ve 5-sülfosalisilik asit SSA ile muamele edilmiş, süpernatanın SSA ile deproteinizasyon yapıldığında daha berrak olduğu gözlenmiştir. Ayrıca TCA ile deproteinizasyon sonucu ölçülen sitrüllin değerlerinin SSA ile deproteinize edilen örneklerdeki miktarlardan yaklaşık iki kat fazla olduğu saptanmıştır. Bu yüzden proteinden arındırma işlemine SSA ile devam edilmiştir. Literatürde her iki yöntemin de kullanıldığı, fakat bizim sonuçlarla benzer şekilde SSA ile deproteinizasyonun background etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (81, 173).

L-sitrüllin gibi üre de diasetilmonoksitle reaksiyona girerek renk oluşturmakta ve yanlış yüksek sonuçların çıkmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ürenin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Literatürlerde

sitrüllin ölçümünde ürenin verdiği interferans ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında ürenin eliminasyonunu sağlamak için deney ortamına çeşitli konsantrasyonlarda üreaz eklenerek ölçümler yapılmış ve en uygun üreaz konsantrasyonunun 200 U/mL olduğu belirlenmiştir.

Bir DDAH enzim ünitesi, 37 °C sıcaklıkta 1 dakika sürede ADMA' dan 1 µmol sitrüllin oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak saflaştırılan enzimin saflığı kontrol edilmiştir. Jelde tek bandın gözlenmesi ile sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin saf olduğu ispatlanmıştır (Şekil 4.10).

Sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enzimi için optimum pH 0.1 M Sodyum fosfat tamponunda 6.5 olarak belirlenmiştir.

Ogawa ve ark. (123), sıçan böbreğinden saflaştırdıkları DDAH enziminin pH 5.5 ile 7.5 arasında aktif olduğunu, ADMA substrat olarak kullanıldığında maksimum aktivitenin pH=6.5'te gözlendiğini rapor etmişlerdir.

Knipp ve ark. (79), sığır beyninden saflaştırdıkları DDAH enziminin en yüksek aktiviteyi pH=6.2, 0.1 M sodyum fosfat tamponunda gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kimoto ve ark. (76) ise insan karaciğerinden DDAH enzimini saflaştırmışlar ve enzimin optimum pH'sını 6.7 olarak saptamışlardır.

Genelde her enzimin aktivitesinin optimum olduğu bir maksimum sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklığın üstünde aktivite düşmeye başlar ve enzimin üç boyutlu yapısında bozulma meydana gelir. Bizim çalışmamızda sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin optimum sıcaklığı 0 °C ile 80 °C arasında ve 5'er °C arayla enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülmüş, DDAH enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 37 °C olarak bulunmuştur. Enzimin 40 °C' den sonra hızla aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Ogawa ve ark. (123) ise sıçan böbreği DDAH enziminin optimal sıcaklığının 55 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjilerini (E_a) düşürerek reaksiyonun ürünler tarafına doğru hızlanmasını sağlarlar. Aktivasyon enerjisinin yükselmesi ve düşmesi bazı parametrelerden

etkilenebilir. Örneğin; reaksiyonun hızı geçiş kompleksi konsantrasyonuyla orantılıdır. Sıcaklığın yükseltilmesi; termik hareket ve enerjiyi arttıracığından geçiş kompleksi konsantrasyonu yükselecek ve bunun sonucu olarak da reaksiyon hızlanacaktır. Çalışmamızda substrat olarak kullanılan ADMA ile yapılan sıcaklık denemelerinden sonra belirlenen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak $1/T$ 'ye karşı grafik çizilmiş ve bu grafikten elde edilen Arrhenius eğrisinin (Şekil.4.14) eğimi kullanılarak DDAH enziminin E_a ve ΔH değeri sırasıyla 38,845 ve 38,703 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Bir enzim için, 10 °C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q_{10} değeri de 1.63 olarak hesaplanmıştır. Literatür araştırmaları sonucunda DDAH enzimi ile ilgili bu tür bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte bazı enzimlerle böyle çalışmaların yapıldığı görülmüştür.

Sıçan böbreğinden saf olarak elde edilen DDAH enziminin molekül ağırlığının saptanmasında SDS-PAGE metodu kullanılmıştır. Enzim eluatu ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de aynı zamanda yürütülmüş (Şekil 4.10) ve log MA-Rf standart grafiği çizilmiştir (Şekil 4.11). Daha sonra saflaştırılan DDAH enziminin Rf değeri hesaplanarak standart grafikten sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin molekül ağırlığı 33560 Da olarak hesaplanmıştır.

Sıçan böbreğinden elde edilen DDAH enziminin aktif formunun molekül ağırlığının hesaplanması amacıyla Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi yapılmıştır. Kolondan standart proteinler birer birer geçirildikten sonra log MA- K_{av} standart grafiği çizilmiştir (Şekil.4.9). Daha sonra enzim çözeltisinin K_{av} değeri yardımıyla standart grafikten enzimin molekül ağırlığı belirlenmiştir. Bu yöntemle aktif enzimin molekül ağırlığı 35870 Da olarak bulunmuştur. DDAH enzimi için Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi ile hesaplanan molekül ağırlıkları ile SDS-PAGE yöntemi ile bulunan molekül ağırlıkları birbirlerine çok yakın değerler olmasından saflaştırılan enzimin monomer yapıda olduğu tespit edilmiştir.

Ogawa ve ark. (123), DDAH enzimini sıçan böbreğinden saflaştırmışlar, molekül ağırlığını jel filtrasyonu ile 32000 ± 500 , SDS-PAGE ile 34000 ± 1000 Da olarak belirlemişlerdir. Kimoto ve ark. (76) ise insan

karaciğerinden saflaştırdıkları DDAH enziminin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 35000 Da bulmuşlardır.

Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan DDAH enziminin tek bir polipeptidden oluştuğu bildirilmiştir (123).

DDAH enziminin fizyolojik şartlardaki substratı ADMA' dır. Çalışmamızda sıçan böbrek dokusundan saflaştırılan DDAH enziminin aktivitesi ADMA substrat olarak kullanılarak ölçülmüş ve ADMA için K_m , V_{max} , k_{cat} ve özgüllük sabiti (V_0) değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla 6 farklı ADMA substratı konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak 466 nm'de enzim aktiviteleri belirlenmiş ve saflaştırılan DDAH enzimi için Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.21 mM ve 0.48 U/mg protein olarak hesaplanmıştır (Şekil.4.16).

Ogawa ve ark. (123), sıçan böbreği DDAH enziminin kinetik özelliklerini incelemişler ve K_m ve V_{max} değerlerini 0.18 mM ve 0.28 U/mg protein olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise V_{max} değeri, bu çalışmadakinin yaklaşık iki katı olarak görülmektedir.

Doygun durumda herhangi bir enzim için limit hızını açıklayan daha genel bir hız sabiti olan k_{cat} 'ın belirlenmesi yararlıdır. k_{cat} sabiti bir mol enzimin birim zamanda ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Bunun diğer bir adı turnover sayısıdır. Eğer bir tepkimede değişik basamaklar varsa ve bir tanesi hız sınırlayıcı ise k_{cat} bu basamak için hız sabitine eşittir. Çeşitli basamaklar kısmen hız kısıtlayıcı olduğu zaman, k_{cat} her bir reaksiyon için belirlenen çeşitli hız sabitlerinin kompleks bir türevi olabilir. Çalışmamızda DDAH enziminin k_{cat} değeri 0.165 s^{-1} olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının en iyi yolu iki tepkime için k_{cat}/K_m oranının karşılaştırılmasıdır. k_{cat} ve K_m parametreleri enzimlerin kinetik verimliliklerini değerlendirmemizi sağlar, fakat parametrelerin her ikisi de bu iş için tamamen yeterli değildir. k_{cat}/K_m oranı bazen E + S'nin E + P'ye dönüşümü için hız sabiti olan özgüllük sabiti (V_0) olarak adlandırılır. Çalışmamızda V_0 değeri $786 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

Literatürde DDAH enziminin k_{cat} ve V_0 değeri ile ilgili tek çalışma Ogawa ve ark.'nın (123) yaptığı çalışmadır ve bu değerler sırasıyla 0.154 s^{-1} ve $855 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak bildirilmiştir.

Sıçan böbreği DDAH enziminin substrat ile kooperativite gösterip göstermediğini anlamak için Hill grafiklemesi yapıldığında, Hill sabiti (h) 0.73 olarak belirlenmiştir. Bu grafikten enzimin ADMA substratı ile negatif kooperativite gösterdiği saptanmıştır (Şekil.4.17).

Kurşun ve civa gibi ağır metallerin enzimlerin serbest -SH gruplarına bağlanarak enzim konformasyonunda değişikliğe yol açmak suretiyle inhibitör etkisini gösterdiği bilinmektedir. Çalışmamızda bazı eser elementlerin enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla saf enzim üzerine son konsantrasyon 0.1 mM olacak şekilde civa, kadmiyum, bakır, çinko, demir ve magnezyum gibi bazı metal iyonları eklenmiş, kadmiyum, civa ve bakırın enzimi tamamen inhibe ettiği, çinkonun enzim aktivitesinde %66'lık bir kayba neden olduğu, ortama demir ve magnezyum eklendiğinde ise minimal bir inhibisyon olduğu gözlenmiştir (Tablo.4.11).

DDAH enziminin dayanıklılığını artırmak için enzim çözeltisine %30 (v/v) olacak şekilde gliserol eklenmiştir. Enzimin %30 gliserol içinde -80 °C'de saklandığında aktivitesini kaybetmediği, gliserol eklenmeden saklandığında ise aktivitesinin %60'lara indiği gözlenmiştir. Bu yüzden enzim %30 gliserol içinde dondurularak saklanmıştır (Tablo 4.12).

Sıçan böbreğinden saflaştırılan DDAH enziminin aminoasit analizi yapılmıştır. Ogawa ve ark. (123) yaptığı çalışmada saflaştırdıkları enzimin triptofan içeriğinin %0.36 olduğunu bildirmişler ve triptofan üzerinden molekül ağırlığını yaklaşık 31600 dalton hesaplamışlardır. Fakat bizim çalışmamızda enzimin triptofan içeriğinin %1.94 olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın aminoasit analizindeki yöntemin değişik olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışması, Türkiye'de DDAH enziminin saflaştırıldığı ilk çalışma özelliği taşımaktadır.

Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan DDAH enzimi ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen DDAH enziminin karakteristik özellikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. DDAH enzimi ile yapılacak daha ileri

kinetik ve yapısal çalışmalar bu enzim ile ilgili daha önemli ve ayrıntılı bilgiler verecektir.

Çeşitli hastalıklarda lülen ADMA düzeyleri arasında farklılıklar göze çarpmaktadır. ADMA düzeyi ile birlikte hücresel ADMA içeriğinin düzenlenmesinde majör rol oynayan DDAH enziminin aktivitesinin de lülmesinin ADMA-NO-Homosistein metabolizması hakkında eldeki mevcut verilere destek sağlayacağı kanaatindeyiz.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, hemen hemen tüm canlı organizmalarda yaygın bir şekilde bulunan ve birçok metabolik olayda önem taşıyan DDAH enziminin aktivitesini ölçmek için kolay uygulanabilir, hassas ve güvenilir spektrofotometrik bir yöntem kurulmuş, daha sonra enzim sıçan böbrek dokusundan çeşitli kromatografi tipleri kullanılarak yüksek bir saflıkla elde edilmiş ve enzimin karakteristik ve kinetik özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca saflaştırılan DDAH aktivitesi üzerine 6 farklı ağır metal iyonunun inhibisyon etkileri araştırılmış ve bu iyonların enzimi farklı oranlarda inhibisyona uğrattıkları tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 6.1'de özetlenmiştir.

Tablo.6.1. Sıçan böbreği DDAH enzimi için yapılan çalışmaların sonuçları

DDAH Enziminin Saflaştırma Basamakları		
Yapılan işlemler	Verim (%)	Saflaştırma oranı
Amonyum sülfat (%40)	88	2.1
Amonyum sülfat (%80)	87	2.2
Sephacryl S-200	78	7.2
QAE-Sephadex	61	70.3
Phenyl-Sepharose	43	507.8
MMA-Sepharose	28	712.4
DDAH Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar		
Optimum pH	6.5	
Optimum Sıcaklık	37 °C	
Aktivasyon Enerjisi (E_a) (Kj/mol)	38,845	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kJ/mol)	38,703	
Q_{10}	1.63	
K_m (mM)	0.21	
V_{max} (U/mg protein)	0.48	
k_{cat}	165	
V_0	786	
Molekül Ağırlık Tayini (Da)		
SDS-PAGE metodu	33560	
Jel filtrasyon kromatografisi	35870	

KAYNAKLAR

1. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao P, Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus, *Am J Cardio* 88: 1201-1203, 2001.
2. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P, Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1455-1459, 2003.
3. Achan V, Tran CT, Arrighi F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P, All trans retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells, *Circ Res* 90: 764-769, 2002.
4. Achan V, Ho HK, Heeschen C, Stuehlinger M, Jang JJ, Kimoto M, Vallance P, Cooke JP, ADMA regulates angiogenesis: genetic and metabolic evidence, *Vasc Med* 10: 7-14, 2005.
5. Aisaka K, Gross SS, Griffiths OW, Levi R, L-arginine availability determines the duration of acetylcholine-induced systemic vasodilation in vivo, *Biochem Res Comm* 163: 710-717, 1989.
6. Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, Toruner FB, Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations, *J Clin End Metab* 92: 1881-1885, 2007.
7. Andrews P, The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range, *Biochem J* 96: 595-606, 1965.
8. Arrighi FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM, Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia, *Circ* 107: 1195-1201, 2003.

9. Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS, Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes, *Metabolism* 51: 843-846, 2003.
10. Aslam S, Santha T, Leone A, Wilcox C, Effects of amlodipine and valsartan on oxidative stress and plasma methylarginines in end-stage renal disease patients on hemodialysis, *Kidney Int* 70: 2109-2115, 2006.
11. Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S, Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide, *Br J Pharmacol* 108: 833-837, 1993.
12. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ, Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor, *Circ Res* 82: 1007-1015, 1998.
13. Barbera JA, Peinado VI, Santos S, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers, *Am J Respir Crit Care Med* 164: 709-713, 2001.
14. Baylis C, Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease, *Nat Clin Pract Nephrol* 2: 209-220, 2006.
15. Baylis C, Mitruka B, Deng A, Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage, *J Clin Invest* 90: 278-281, 1992.
16. Berger SL, The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature* 447: 407-412, 2007.
17. Birdsey GM, Leiper JM, Vallance P, Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line, *Acta Physiol Scand* 168: 73-79, 2000.
18. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan J, Tangphao O, Blaschke TF, John JS, Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction, *Circ* 98: 1842-1847, 1998.

19. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frolich JC, Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease, *J Am Coll Cardiol* 32: 1336-1344, 1998.
20. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP, An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes, *J Am Coll Cardiol* 36: 2287-2295, 2000.
21. Boger RH, Cooke JP, Vallance P, ADMA: an emerging cardiovascular risk factor, *Vasc Med* 10 Suppl 1: S1-S2, 2005.
22. Boger RH, Sydow K, Borlak T, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM, LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells, *Circ Res* 87: 99-105, 2000.
23. Bogumil R, Knipp M, Fundel SM, Vasak M, Characterization of dimethylargininase from bovine brain: evidence for a zinc binding site, *Biochem* 37: 4791-4798, 1998.
24. Brands MW, Bell TD, Gibson B, Nitric oxide may prevent hypertension early in diabetes by counteracting renal actions of superoxide, *Hypertens* 43: 57-63, 2004.
25. Brenner BM, Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease, *Kidney Int* 23: 647-655, 1983.
26. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S, Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy, *N Engl J Med* 345: 861-869, 2001.
27. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE, The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications, *Hum Reprod Update* 4: 25-42, 1998.

28. Bultink IE, Teerlink T, Heijst JA, Dijkmans BA, Voskuyl AE, Raised plasma levels of asymmetric dimethylarginine are associated with cardiovascular events, disease activity, and organ damage in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann Rheum Dis* 64: 1362-1365, 2005.
29. Chan NN, Chan JC, Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* 45: 1609-1616, 2002.
30. Chen JW, Hsu NW, Wu TC, Lin SJ, Chang MS, Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrome X, *Am J Cardiol* 90: 974-982, 2002.
31. Chen MF, Xie XM, Yang TL, Wang YJ, Zhang XH, Luo BL, Li YJ, Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II, *J Vasc Res* 44: 391-402, 2007.
32. Choi KC, Kim NH, An MR, Kang DG, Kim SW, Lee J, Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems in streptozotocin-induced diabetic rats, *Kidney Int Suppl* 60: S23-27, 1997.
33. Cooke JP, NO and angiogenesis, *Atheroscler Suppl* 4: 53-60, 2003.
34. Cooke JP, Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 2032-2037, 2000.
35. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoglu I, Karter Y, Genc H, Vehid S, Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension, *J Hum Hypertens* 19: 629-633, 2005.
36. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger M, Wang B, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson A, Cooke JP, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis, *Circ* 108: 3042-3047, 2003.

37. Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE, Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N^G, N^G-dimethylarginine in human essential hypertension, *Am J Hypertens* 15: 590-593, 2002.
38. Deng X, Welch WJ, Wilcox CS, Renal vasoconstriction during inhibition of NO synthase: Effects of dietary salt, *Kidney Int* 46: 639-646, 1994.
39. Deng X, Welch WJ, Wilcox CS, Renal vasodilation with L-arginine: Effects of dietary salt, *Hypertens* 26: 256-262, 1995.
40. Deng X, Welch WJ, Wilcox CS, Role of nitric oxide in short-term and prolonged effects of angiotensin II on renal hemodynamics, *Hypertens* 27: 1173-1179, 1996.
41. Dowling RB, Newton R, Robichaud A, Cole PJ, Barnes PJ, Wilson R, Effect of inhibition of nitric oxide synthase on *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory mucosa in vitro, *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 950-958, 1998.
42. Eid HM, Lyberg T, Arnesen H, Seljeflot I, Insulin and adiponectin inhibit the TNFalpha-induced ADMA accumulation in human endothelial cells: The role of DDAH, *Atherosclerosis* (Epub ahead of print): 2006.
43. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B, Wennergren M, Hagberg H, Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia, *Acta Obstet Gynecol Scand* 80: 602-608, 2001.
44. Erdely A, Freshour G, Maddox DA, Olson JL, Samsell L, Baylis C, Renal disease in rats with type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production, *Diabetologia* 47: 1672-1676, 2004.
45. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM, Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocrine Reviews* 23: 599-622, 2002.

46. Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS, Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia, *Lancet* 342: 242-243, 1993.
47. Frey D, Braun O, Briand C, Vasak M, Grutter MG, Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors, *Structure* 14: 901-911, 2006.
48. Galkin A, Kulakova L, Sarikaya E, Lim K, Howard A, Herzberg O, Structural insight into arginine degradation by arginine deiminase, an arginine, *J Biol Chem* 279: 14001-14008, 2004.
49. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S, Regional and cardiac haemodynamic effects of N^G , N^G ,dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats, *Br J Pharmacol* 110: 1457-1464, 1993
50. Goligorsky MS, Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it, *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F871-F880, 2005.
51. Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H, Stamler JS, Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues, *J Biol Chem* 277: 9637-9640, 2002.
52. Griendling KK, FitzGerald Ga, Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: Animal and human studies, *Circ* 108: 2034-2040, 2003.
53. Hartzoulakis B, Rossiter S, Gill H, O'Hara B, Steinke E, Gane PJ, Hurtado-Guerrero R, Leiper JM, Vallance P, Rust JM, Selwood DL, Discovery of inhibitors of the penten superfamily protein dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), by virtual screening and hit analysis, *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3953-3956, 2007.
54. Hasegawa K, Wakino S, Tanaka T, Kimoto M, Tatematsu S, Kanda T, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, Kurabayashi M, Saruta T, Hayashi K, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial

growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1488-1494, 2006.

55. Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, Kimoto M, Hayashi K, Itoh H, Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2, *Circ Res* 101: e2-e10, 2007.

56. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H, Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia, Role of oxidized LDL, *Circ* 93: 1346-1353, 1996.

57. Herpin A, Cunningham C, Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes, *FEBS J* 274: 2977-2985, 2007.

58. Ho QT, Kuo CJ, Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications, *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1349-1357, 2007.

59. Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley G, Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine, *Circ* 108: 1575-1580, 2003.

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

61. Hruska KA, Saab G, Chaudhary LR, Quinn CO, Lund RJ, Surendran K, Kidney-bone, bone-kidney, and cell-cell communications in renal osteodystrophy, *Semin Nephrol* 24: 25-38, 2004.

62. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A, Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum

asymmetric dimethylarginine in essential hypertension, *Jpn Circ J* 65: 775-778, 2001.

63. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A, Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus, *Circ J* 66: 811-815, 2002.

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

65. Jia SJ, Jiang DJ, Hu CP, Zhang XH, Deng HW, Li YJ, Lysophosphatidylcholineinduced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells, *Vascul Pharmacol* 44: 143-148, 2006.

66. Jiang DJ, Jia SJ, Yan J, Zhou Z, Yuan Q, Li YJ, Involvement of DDAH/ADMA/NOS pathway in nicotine-induced endothelial dysfunction, *Biochem Biophys Res Commun* 349: 683-693, 2006.

67. Jiang JL, Zhang XH, Li NS, Rang WQ, Feng Y, Hu CP, Li YJ, Deng HW, Probucol decreases asymmetrical dimethylarginine level by alternation of protein arginine methyltransferase I and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity, *Cardiovasc Drugs Ther* 20: 281-294, 2006.

68. Jones LC, Tran CTL, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P, Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* 310: 836-843, 2003.

69. Joshi MS, Ferguson TB, Jr. Johnson FK, Johnson RA, Parthasarathy S, Lancaster JR, Jr, Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9982-9987, 2007.

70. Kakimoto Y, Akazawa S, Isolation and identification of N^G,N^G-and N^G,N^G-dimethylarginine, N-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl-

and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine, *J Biol Chem* 245: 5751-5758, 1970.

71. Kearns AE, Donohue MM, Sanyal B, Demay MB, Cloning and characterization of a novel protein kinase that impairs osteoblast differentiation in vitro, *J Biol Chem* 276: 42213-42218, 2001.

72. Kelly FJ, Anderson S, Thompson MM, Oyama TT, Kennefick TM, Corless CL, Roman RJ, Kurtzberg L, Pratt BM, Ledbetter SR, Acute and chronic renal effects of recombinant human TGF-beta2 in the rat, *J Am Soc Nephrol* 10: 1264-1273, 1999.

73. Keynan S, Hirshberg B, Levin-Iaina N, Wexler ID, Dahan R, Reinhartz E, Ovadia H, Wollman Y, Chernihovskiy T, Iaina A, Raz I, Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus, *Kidney Int* 58: 740-747, 2000.

74. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC, Haller H, Ritz E, Fliser D. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease, *J Am Soc Nephrol* 13: 170-176, 2002.

75. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D, Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function - a meta-analysis, *Nephrol Dial Transplant* 21: 2446-2451, 2006.

76. Kimoto M, Sasakawa T, Tsuji H, Miyatake S, Oka T, Okita M, Ogawa T, Purification, cDNA cloning and expression of N^G-N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Eur J Biochem*, 258:863-868,1998

77. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Jose P, Welch WJ, Wilcox CS, Effects of dietary salt intake on plasma arginine, *Am J Physiol* 280: R1069-R1075, 2001.

78. Knipp M, How to control NO production in cells: N(omega),N(omega)-dimethyl-Larginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target, *Chembiochem* 7: 879-889, 2006.
79. Knipp M, Braun O, Gehrig PM, Sack R, Vasak M, Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation, *J Biol Chem* 278: 3410-3416, 2003.
80. Knipp M, Charnock JM, Garner CD, Vasak M, Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain, Zn(II) release activates DDAH-1, *J Biol Chem* 276: 40449-40456, 2001.
81. Knipp M, Vasak M, A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline, *Anal Biochem* 286: 257-264, 2000.
82. Komers R, Anderson S, Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney, *Am J Physiol* F1121-F1137, 2003.
83. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Allison KM, Anderson S, Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes, *Am J Physiol* 279: F573-583, 2000.
84. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Schutzer WE, Reed JF, Mader SL, Anderson S, Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes, *J Clin Invest* 107: 889-898, 2001.
85. Komine N, Thomson SC, Blantz RC, Gabbai FB, Role of macula densa derived nitric oxide in the hyperfiltration of streptozotocin diabetic rats, *J Am Soc Nephrol* 10: 684A, 1999.
86. Kone BC, Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health, *Semin Nephrol* 24: 299-315, 2004.
87. Kone BC, NO break-ins at water gate, *Hypertens* 48: 29-30, 2006.

88. Laemmli DK, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-684,1970.
89. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P, S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: Further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 13527-13532, 2002.
90. Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, Rossiter S, Anthony S, Madhani M, Selwood D, Smith C, Wojciak-Stothard B, Rudiger A, Stidwill R, McDonald NQ, Vallance P, Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis, *Nat Med* 13: 198-203, 2007.
91. Leiper J, Vallance P, Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide sythases, *Cardiovasc Res* 43: 542-548, 2003.
92. Leiper J, Vallance P, New tricks from an old dog: nitric oxide-independent effects of dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1419-1420, 2006.
93. Leiper JM, Maria JS, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GStJ, Vallance P, Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases, *Biochem J* 343: 209-214, 1999.
94. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP, Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Circ* 106: 987-992, 2002.
95. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr M, Randall RJ, Protein measurement with Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.

96. Lu CW, Xiong Y, He P, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 overexpression improves impaired nitric oxide synthesis of endothelial cells induced by glycated protein, *Nitric Oxide* 16: 94-103, 2007.
97. Lu R, Hu CP, Wu XP, Liao EY, Lo YJ, Effect of age on bone mineral density and the serum concentration of endogenous nitric oxide synthase inhibitors in rats, *Comp Med* 52: 224-228, 2003.
98. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger MC, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P, Mild to moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, *J Am Coll Cardiol* 38: 111-116, 2001.
99. Maas R, Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA), *Vasc Med* 10 Suppl 1: S49-S57, 2005.
100. Maas R, Boger RH, Schwedhelm E, Casas JP, Lopez-Jaramillo P, Serrano N, Diaz LA, Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in Colombian women with pre-eclampsia, *JAMA* 291: 823-824, 2004.
101. Maas R, Tan-Andreesen J, Schwedhelm E, Schulze F, Boger RH, A stable-isotope based technique for the determination of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity in mouse tissue, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 851: 220-228, 2007.
102. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russel RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P, Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Br J Pharmacol* 119: 1533-1540, 1996.
103. MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P, Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways, *Kidney Int* 45: 737-742, 1994.
104. Maeda T, Yoshimura T, Okamura H, Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in maternal and fetal circulation, *J Soc Gynecol Investig* 10: 2-4, 2003.

105. Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H, Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors of NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia, *Br J Pharmacol* 126: 211-218, 1999.
106. Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, Fujimura T, Matsuoka H, Kimoto M, Kato S, Imaizumi T, Okuda S, Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 17: 2176-2183, 2006.
107. Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S, Matsuguma K, Shibata R, Fukami K, Matsuoka H, Imaizumi T, Okuda S, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 18: 1525-1533, 2007.
108. Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, Marz W, Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study), *Clin Chem* 53: 273-283, 2007.
109. Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR, Alkaline buffers release EDRF from bovine cultured aortic endothelial cells, *Br J Pharmacol* 103: 1295-1302, 1991.
110. Mittermayer F, Mayer BX, Meyer A, Winzer C, Pacini G, Wagner OF, Wolzt M, Kautzky-Willer A, Circulating concentrations of asymmetrical dimethyl-L-arginine are increased in women with previous gestational diabetes, *Diabetologia* 45: 1372-1378, 2002.
111. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T, Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis, *Circ* 99: 1141-1146, 1999.

112. Monsalve E, Oviedo PJ, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A, Hermenegildo C, Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells, *Cardiovasc Res* 73: 66-72, 2007.
113. Mookerjee RP, Dalton RN, Davies NA, Hodges SJ, Turner C, Williams R, Jalan R, Inflammation is an important determinant of level of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in acute liver failure: *Liver Transplantation* 13: 400-405, 2007
114. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, McDonald N, Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Na Struct Biol* 8: 679-683, 2001.
115. Napoli C, Sica V, de NF, Pignalosa O, Condorelli M, Ignarro LJ, Liguori A, Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension, *Am Heart J* 148: e5, 2004.
116. Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MPC, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PAM, The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA), *Clin Nutrition* 22: 17-22, 2003.
117. Nijveldt RJ, Teerlink T, van Guldener C, Prins HA, van Lambalgen AA, Stehouwer CDA, Rauwerda JA, van Leeuwen PAM, Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia, *Nephrol Dial Transplant* 18: 2542-2550, 2003.
118. Nijveldt RJ, Siroen MP, Teerlink T, Van Leeuwen PA, Elimination of asymmetric dimethylarginine by the kidney and the liver: a link to the development of multiple organ failure? *J Nutr* 134: 2848S-2852S, 2004.

119. Nonaka S, Tsunoda M, Aoyama C, Funatsu T, Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine in rat plasma and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in rat kidney using a monolithic silica column, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 843: 170-174, 2006.
120. O'Driscoll G, Green D, Maiorana A, Stanton K, Colreavy F, Taylor R., Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulindependent diabetes mellitus, *J Am Coll Cardiol* 33: 1506-1511, 1999.
121. O'Driscoll G, Green D, Rankin J, Stanton K, Taylor R, Improvement in endothelial function by angiotensin converting enzyme inhibition in insulin-dependent diabetes mellitus, *J Clin Invest* 100: 678-684, 1997.
122. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K, Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^G,N^G-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 148: 671-677, 1987.
123. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K, Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney, *J Biol Chem* 264: 10205-10209, 1989.
124. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K, Metabolism of N^G,N^G- and N^G,N^G-dimethylarginine in rats, *Arch Biochem Biophys* 252: 526-537, 1987.
125. Okubo K, Hayashi K, Wakino S, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T, Role of asymmetrical dimethylarginine in renal microvascular endothelial dysfunction in chronic renal failure with hypertension, *Hypertens Res* 28: 181-189, 2005.
126. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS, Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI or ARB, *Kidney Int* 61: 186-194, 2002.

127. Onozato ML, Tojo A, Leiper J, Fujita T, Palm F, Wilcox CS, Expression of DDAH and PRMT isoforms in the diabetic rat kidney; effects of angiotensin II receptor blocker, *Diabetes* . 2007. Ref Type: In Press
128. Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL, NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity, *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F819F825, 2001.
129. Paiva H, Laakso J, Kahonen M, Turjanmaa V, Koobi T, Majahalme S, Lehtimäki T, Ruukonen I, Laaksonen R, Asymmetric dimethylarginine and hemodynamic regulation in middle-aged men, *Metabolism* 55: 771-777, 2006.
130. Palm F, Buerk DG, Carlsson PO, Hansell P, Liss P, Reduced nitric oxide concentration in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on renal oxygenation and microcirculation, *Diabetes* 54: 3282-3287, 2005.
131. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327: 524-526, 1987.
132. Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC, Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro, *Am J Pathol* 150: 1835-1844, 1997.
133. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC, Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells, *J Clin Invest* 100: 3131-3139, 1997.
134. Patschan S, Li H, Brodsky S, Sullivan D, De Angelis DA, Patschan D, Goligorsky MS, Probing lipid rafts with proximity imaging: actions of

proatherogenic stimuli, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2210-H2219, 2006.

135. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, Tripepi G, Sesti G, Zoccali C, Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension, *J Am Coll Cardiol* 46: 518-523, 2005.

136. Pettersson A, Hedner T, Milsom I, Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in preeclampsia, *Acta Obstet Gynecol Scand* 77: 808-813, 1998.

137. Polotskaia A, Wang M, Patschan S, Addabbo F, Chen J, Goligorsky MS, Regulation of arginine methylation in endothelial cells: role in premature senescence and apoptosis, *Cell Cycle* . 2007. Ref Type: In Press

138. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM, Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase, *J Biol Chem* 267: 24173-24176, 1992.

139. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C, Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach, *J Am Soc Nephrol* 16: 2449-2455, 2005.

140. Remuzzi G, Ruggenenti P, Perico N, Chronic renal disease: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition, *Ann Intern Med* 136: 604-615, 2002.

141. Rossiter S, Smith CL, Malaki M, Nandi M, Gill H, Leiper JM, Vallance P, Selwood DL, Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *J Med Chem* 48: 4670-4678, 2005.

142. Ryan R, Thornton J, Duggan E, McGovern E, O'Dwyer MJ, Ryan AW, Kelleher D, McManus R, Ryan T, Gene polymorphism and requirement for vasopressor infusion after cardiac surgery, *Ann Thorac Surg* 82: 895-901, 2006.
143. Salazar FJ, Alberola A, Pinilla JM, Romero JC, Quesada T, Salt-induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibition, *Hypertens* 22: 49-55, 1993.
144. Santa MJ, Vallance P, Charles IG, Leiper JM, Identification of microbial dimethylarginine dimethylaminohydrolase enzymes, *Mol Microbiol* 33: 1278-1279, 1999.
145. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaidis KH, Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia, *Lancet* 361: 1511-1517, 2003.
146. Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Postel SC, Tager M, Bode-Boger SM, Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *J Am Soc Nephrol* 16: 892-898, 2005.
147. Schaefer CB, Ooi SK, Bestor TH, Bourc'his D, Epigenetic decisions in mammalian germ cells, *Science* 316: 398-399, 2007.
148. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Munzel T, Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study, *Circ Res* 97: e53-e59, 2005.
149. Schnackenberg CG, Wilcox CS, The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes, *Kidney Int* 59: 1859-1864, 2001.

150. Schoonmaker GC, Fallet RW, Carmines PK, Superoxide anion curbs nitric oxide modulation of afferent arteriolar Ang II responsiveness in diabetes mellitus, *Am J Physiol* 278: F302-309, 2000.
151. Schulman IH, Zhou MS, Raji L, Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension, *J Hypertens Suppl* 24: S45-S50, 2006.
152. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH, Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects, *Eur J Clin Invest* 35: 622-626, 2005.
153. Scuteri A, Stuehlinger MC, Cooke JP, Wright JG, Lakatta EG, Anderson DE, Fleg JL, Nitric oxide inhibition as a mechanism for blood pressure increase during salt loading in normotensive postmenopausal women, *Journal of Hypertension* 21: 1339-1346, 2003.
154. Segal MS, Baylis C, Johnson RJ, Endothelial health and diversity in the kidney, *J Am Soc Nephrol* 17: 323-324, 2006.
155. Shin SJ, Lai FJ, Wen JD, Hsiao PJ, Hsieh MC, Tzeng TF, Chen HC, Guh JY, Tsai JH, Neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in outer medulla of streptozotocin-induced diabetic rat kidney, *Diabetologia* 43: 649-659, 2000.
156. Siroen MP, Teerlink T, Bolte AC, van Elburg RM, Richir MC, Nijveldt RJ, van der HB, Van Leeuwen PA, No compensatory upregulation of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in preeclampsia, *Gynecol Obstet Invest* 62: 7-13, 2006.
157. Siroen MP, Warle MC, Teerlink T, Nijveldt RJ, Kuipers EJ, Metselaar HJ, Tilanus HW, Kuik DJ, van dS, Jr., Meijer S, van der HB, Van Leeuwen PA, The transplanted liver graft is capable of clearing asymmetric dimethylarginine, *Liver Transpl* 10: 1524-1530, 2004.

158. Smith CL, Anthony S, Hubank M, Leiper JM, Vallance P, Effects of ADMA upon gene expression: an insight into the pathophysiological significance of raised plasma ADMA, *PLoS Med* 2: 1031-1043, 2005.
159. Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, Vallance P, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulated ADMA levels VEGF expression and cell phenotype, *Biochem Biophys Res Comm* 308: 984-989, 2003.
160. Sorrenti V, Mazza F, Campisi A, Vanella L, Li VG, Di GC, High glucose-mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells, *Curr Neurovasc Res* 3: 49-54, 2006.
161. Stone EM, Costello AL, Tierney DL, Fast W, Substrate-assisted cysteine deprotonation in the mechanism of dimethylargininase (DDAH) from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem* 45: 5618-5630, 2006.
162. Stone EM, Person MD, Costello NJ, Fast W, Characterization of a transient covalent adduct formed during dimethylarginine dimethylaminohydrolase catalysis, *Biochem* 44: 7069-7078, 2005.
163. Stoos BA, Garcia NH, Garvin JL, Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct, *J Am Soc Nephrol* 6: 89-94, 1995.
164. Stuhlinger M, Abbasi F, Chu J, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS, Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, *JAMA* 287: 1420-1426, 2002.
165. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP, Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine, *Circ* 108: 933-938, 2003.

166. Stuhlinger MC, Stanger O, Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction, *Curr Drug Metab* 6: 3-14, 2005.
167. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP, Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: Role of asymmetric dimethylarginine, *Circ* 104: 2569-2575, 2001.
168. Sugawara K, Yoshizawa Y, Tzeng S, Epstein WL, Fukuyama K, Colorimetric determination of citrulline residues in proteins, *Anal Biochem* 265: 92-96, 1998
169. Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, Kushiro M, Hayashi Y, Hiragushi K, Wada J, Makino H, Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy, *Diabetologia* 41: 1426-1434, 1998.
170. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC, Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension, *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 652658, 1999.
171. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Hornig B, Frolich JC, Boger RH, ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins, *Cardio Res* 57: 244252, 2003.
172. Sydow K, Mondon CE, Cooke JP, Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA, *Vasc Med* 10 Suppl 1: S35-S43, 2005.
173. Tain YL, Baylis C, Determination of dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in the kidney, *Kidney Int* 72: 886-889, 2007.

174. Tan B, Jiang DJ, Huang H, Jia SJ, Jiang JL, Hu CP, Li YJ, Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway, *Vascul Pharmacol* 46: 338-345, 2007.
175. Tanaka M, Osanai T, Murakami R, Sasaki S, Tomita H, Maeda N, Satoh K, Magota K, Okumura K, Effect of vasoconstrictor coupling factor 6 on gene expression profile in human vascular endothelial cells: enhanced release of asymmetric dimethylarginine, *J Hypertens* 24: 489-497, 2006.
176. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, Parving HH, Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes, *Diabetes Care* 27: 765-769, 2004.
177. Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, Homma K, Yoshioka K, Hasegawa K, Sugano N, Kimoto M, Saruta T, Hayashi K, Role of nitric oxide-producing and -degrading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 18: 741-749, 2007.
178. Tawakol A, Omland T, Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in humans, *Circ* 95: 1119-1121, 1997.
179. Teerlink T, ADMA metabolism and clearance, *Vasc Med* 10 Suppl 1: S73-S81, 2005.
180. Thomson SC, Deng A, Komine N, Hammes JS, Blantz RC, Gabbai FB, Early diabetes as a model for testing the regulation of juxtaglomerular NOS I, *Am J Physiol* 287: F732-F738, 2004.
181. Tian N, Thrasher KD, Gundy PD, Hughson MD, Manning RD, Jr, Antioxidant treatment prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension, *Hypertens* 45: 934-939, 2005.

182. Tojo A, Kimoto M, Wilcox CS, Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin, *Kidney Int* 58: 2075-2083, 2000.
183. Tojo A, Madsen K, Wilcox CS, Expression of immunoreactive nitric oxide synthase isoforms in rat kidney: effects of dietary salt and losartan, *Jpn Heart J* 36: 389-398, 1995.
184. Tojo A, Onozato ML, Fujita T, Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases, *Med Mol Morphol* 39: 2-7, 2006.
185. Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS, Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney, *Kidney Int* 52: 1593-1601, 1997.
186. Tokuo H, Yunoue S, Feng L, Kimoto M, Tsuji H, Ono T, Saya H, Araki N, Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *FEBS Lett* 494: 48-53, 2001.
187. Tomikawa J, Fukatsu K, Tanaka S, Shiota K, DNA methylation-dependent epigenetic regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene in trophoblast cell lineage, *J Biol Chem* 281: 12163-12169, 2006.
188. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM, Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins, *Genomics* 68: 101-105, 2000.
189. Tran CTL, Leiper JM, Vallance P, The DDAH/ADMA/NOS pathway, *Atherosclerosis Supplement* 4: 33-40, 2003.
190. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC, Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2649-H2656, 2005.

191. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T, Regulation of cytokine induced nitric oxide synthasis by asymmetric dimethylarginine, *Cir Res* 92: 226-233, 2003.
192. Valkonen VP, Tuomainen TP, Laaksonen R, DDAH gene and cardiovascular risk, *Vasc Med* 10 Suppl 1: S45-S48, 2005.
193. Vallance P, Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk, *Lancet* 358: 2096-2097, 2001.
194. Vallance P, Bush HD, Mok BJ, Hurtado-Guerrero R, Gill H, Rossiter S, Wilden JD, Caddick S, Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates, *Chem Commun (Camb)* 44: 5563-5565, 2005.
195. Vallance P, Leiper J, Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1: 939-950, 2002.
196. Vallance P, Leiper J, Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1023-1030, 2004.
197. Vallance P, Leiper J, Asymmetric dimethylarginine and kidney disease--marker or mediator? *J Am Soc Nephrol* 16: 2254-2256, 2005.
198. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S, Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure, *Lancet* 339: 572575, 1992.
199. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S, Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis, *J Cardiovasc Pharmacol* 20: S60-S62, 1992.
200. Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Bohmer KP, Sterzel RB, Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy, *J Am Soc Nephrol* 11: 71-79, 2000.

201. Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Kanda T, Homma K, Yoshioka K, Sugano N, Saruta T, Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats, *Hypertens Res* 28: 255-262, 2005.
202. Wanby P, Teerlink T, Brudin L, Brattstrom L, Nilsson I, Palmqvist P, Carlsson M, Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a risk marker for stroke and TIA in a Swedish population, *Atherosclerosis* 185: 271-277, 2006.
203. Wang C, Xu D, Zhang L, Xie D, Guo H, Molecular dynamics and density functional studies of substrate binding and catalysis of arginine deiminase, *J Phys Chem B* 111: 3267-3273, 2007.
204. Wang D, Gill P, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, Dennehy K, Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Leone A, Tojo A, Welch WJ, Wilcox CS, Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO, *Circ Res* 101: 627-635, 2007.
205. Wang D, Iversen J, Wilcox CS, Strandgaard S, Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal polycystic kidney disease, *Kidney Int* 64: 1381-1388, 2003.
206. Wang D, Strandgaard S, Raggio J, Leone A, Wilcox CS, Plasma asymmetric dimethylarginine in patients with ADPKD relationship to cNOS activity and endothelial function, *J Am Soc Nephrol* 16: 360A. 2005. Ref Type: Abstract
207. Wang D, Wang W, Gill P, Welch WJ, Wilcox CS, DDAH-2 regulates endothelial function, eNOS expression and nitric oxide activity in rat mesenteric resistance vessels, *AHA 61st Annual High Blood Pressure Research Conference 2007* : 152 (LB32). 2007. Ref Type: Abstract

208. Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE, Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease, *Atherosclerosis* 184: 383-388, 2006.
209. Wang J, Sim AS, Wang XL, Wilcken DE, L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells, *Cell Mol Life Sci* 63: 2838-2846, 2006.
210. Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T, Thuneke F, Frohlich M, Tschentscher P, Schwedhelm E, Boger R, Meinertz T, Munzel T, AT1-receptor blockade with irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease, *Atherosclerosis* (Epub ahead of print): 2006.
211. Weber K, Osborn M, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J Biol Chem* 244: 4406-4412, 1969.
212. Welch WJ, Wilcox CS, Macula densa arginine delivery and uptake in the rat regulates glomerular capillary pressure: effects of salt intake, *J Clin Invest* 100: 2235-2242, 1997.
213. Wells SM, Holian A, Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 520-528, 2007.
214. Wilcken DE, Sim AS, Wang J, Wang XL, Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism, *Mol Genet Metab* 2007.
215. Wilcken DE, Wang J, Sim AS, Green K, Wilcken B, Asymmetric dimethylarginine in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: relevance of renal function, *J Inherit Metab Dis* 29: 30-37, 2006.

216. Wilcox CS. L-arginine-NO pathway, In: *The Kidney: Physiology and pathophysiology*, edited by Seldin DW and Giebisch G, New York: Raven Press, 2000, p. 849-871.
217. Wilcox CS, Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R913-R935, 2005.
218. Wilcox CS, Nitric oxide synthase and cyclooxygenase in the kidneys. In: *Principles of Molecular Medicine*, edited by Runge MS and Patterson C, Totowa: Humana Press, 2006, p. 606-612.
219. Wilcox CS, Deng X, Welch WJ, NO generation and action during changes in salt intake: Roles of nNOS and macula densa, *Am J Physiol* 274: R1588-R1593, 1998.
220. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH, Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11993-11997, 1992.
221. Wojciak-Stothard B, Torondel B, Tsang LY, Fleming I, Fisslthaler B, Leiper JM, Vallance P, The ADMA/DDAH pathway is a critical regulator of endothelial cell motility, *J Cell Sci* 120: 929-942, 2007.
222. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL, Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6770-6774, 1996.
223. Xia Y, Tsai A, Berka V, Zweier JL, Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase, *J Biol Chem* 273: 25804-25808, 1998.
224. Xia Y, Zweier JL, Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages, *Proc Natl Acad Sci* 94: 6954-6958, 1997.

225. Xin HY, Jiang DJ, Jia SJ, Song K, Wang GP, Li YJ, Chen FP, Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells, *Thromb Haemost* 97: 830-838, 2007.
226. Xiong Y, Fu Y, Fu S, Zhou H. Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes, *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 191-196, 2003.
227. Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y, Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes, *Life Sci* 77: 149-159, 2005.
228. Yang TL, Chen MF, Luo BL, Xie QY, Jiang JL, Li YJ, Fenofibrate decreases asymmetric dimethylarginine level in cultured endothelial cells by inhibiting NF-kappaB activity, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371: 401-407, 2005.
229. Yin QF, Fu SH, He P, Xiong Y, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibition and asymmetric dimethylarginine accumulation contribute to endothelial dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: effects of aminoguanidine, *Atherosclerosis* 190: 5361, 2007.
230. Yin QF, Xiong Y, Pravastatin restores DDAH activity and endothelium-dependent relaxation of rat aorta after exposure to glycated protein, *J Cardiovasc Pharmacol* 45: 525-532, 2005.
231. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM, Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension, *J Clin Invest* 77: 1925-1930, 1986.
232. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R, Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis, *J Clin Invest* 99: 2625-2634, 1997.

233. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F, Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P, *J Clin Invest* 94: 2036-2044, 1994.
234. Zoccali C, ADMA: a critical cardio-renal link in heart failure? *Eur J Clin Invest* 33: 361362, 2003.
235. Zoccali C, Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective, *Kidney Int* 70: 26-33, 2006.
236. Zoccali C, Benedetto F, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, Boger RH, Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease, *J Am Soc Nephrol* 13: 490-496, 2002.
237. Zoccali C, Bode-Boger SM, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich JC, Boger RH, Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study, *Lancet* 358: 2113-2117, 2001.
238. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Böger R, on behalf of the CREED Investigators, Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients, *Kidney Int* 62: 339-345, 2002.