
Dimetylgarginín dimetylaminohydroláza – ďalší faktor v procese aterogenézy?

¹MAREK PYTLIAK, ²VIOLA VARGOVÁ, ³VIOLA MECHÍROVÁ, ⁴JÁN FEDAČKO
Košice, Slovenská republika

PYTLIAK M, VARGOVÁ V, MECHÍROVÁ V, FEDAČKO J. Dimetylgarginín dimetylaminohydroláza – ďalší faktor v procese aterogenézy? *Cardiol* 2008;17(3):130–133

Enzým dimetylgarginín dimetylaminohydroláza metabolizuje asymetrický dimetylgarginín a asymetrický monometylgarginín na citrulín a metylamín. Po zistení, že asymetrický dimetylgarginín je endogénnym inhibítorom všetkých troch izoformiem syntázy oxidu dusnatého, sa na biológiu dimetylgarginín dimetylaminohydrolázy sústredila veľká pozornosť. Koncentrácie asymetrického dimetylgarginínu sú zvýšené pri rozličných kardiovaskulárnych ochoreniach, niektoré z nich sa spájajú s poruchou syntézy oxidu dusnatého. Preto sa zdá, že inhibícia NO-syntázy asymetrickým dimetylgarginínom predstavuje nový mechanizmus regulácie produkcie oxidu dusnatého *in vivo*. Navyše aktivita dimetylgarginín dimetylaminohydrolázy je potrebná na udržanie koncentrácií asymetrického dimetylgarginínu pod prahom, nad ktorým dochádza k inhibícii NO-syntázy, alebo slúži na jemné doladovanie aktivity NO-syntázy tým, že udržiava jej tonickú inhibíciu.

Kľúčové slová: dimetylgarginín dimetylaminohydroláza – DDAH – kardiovaskulárne riziko – asymetrický dimetylgarginín – ateroskleróza

PYTLIAK M, VARGOVA V, MECHIROVA V, FEDACKO J. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase – the next factor in the atherogenesis process? *Cardiol* 2008;17(3):130–133

The enzyme dimethylarginine dimethylaminohydrolase metabolizes asymmetrically methylated arginine and asymmetrical dimethylarginine to citrulline and methylamine. After the discovery that asymmetrical dimethylarginine is a competitive inhibitor of all three isoforms of nitric oxide synthase, interest was focused on the biology and physiology of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine are elevated in a range of cardiovascular diseases. Some of them are associated with impaired nitric oxide synthesis. This has led to the suggestion that inhibition of nitric oxide synthase activity by asymmetrical dimethylarginine represents a novel mechanism of regulation of nitric oxide production. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity may be required to maintain levels of asymmetrical dimethylarginine below the concentration that inhibits nitric oxide synthesis.

Key words: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase – DDAH – Cardiovascular risk – Asymmetrical dimethylarginine – Atherosclerosis

Endotelová dysfunkcia je charakterizovaná nerovnováhou medzi relaxačne a kontrakčne pôsobiacimi faktormi. Môže byť príčinou alebo dôsledkom cievnej choroby a jedným z kardiovaskulárnych rizikových faktorov. Porucha endotelovej funkcie predchádza morfológické zmeny a porušený endotel môže zapríčiniť vazospazmus, vazokonstrikciu, nadmernú trombózu a abnormálnu vaskulárnu proliferáciu. Narušená je vazomotilita a permeabilita, rovnováha medzi koaguláciou a fibrinolýzou, zloženie subendotelového matrixu, extravazácia leukocytov a proliferácia hladkosvalových buniek. Endotelová dysfunkcia vedie *in vitro* k adhézii leukocytov, infiltrácii cievnej steny monocytmi, makrofágmi a lipoproteínmi. Toto je prvé štádium tvorby penových buniek v procese aterosklerózy.

Oxid dusnatý (NO) je doposiaľ najpotentnejším známym vazodilatátorom. Okrem vazodilatačnej funkcie má

však aj mnoho iných účinkov. Znížená tvorba NO zvyšuje adhéziu trombocytov so zvýšeným uvoľňovaním doštičkového rastového faktora PDGF, čo vedie k migrácii a proliferácii buniek hladkej svaloviny a promócií aterosklerotického procesu. NO vzniká z aminokyseliny L-arginínu pomocou NO-syntázy (NOS) a jeho tvorbu potláča kompetitívna inhibícia tohto enzýmu, najmä metylovanými analógmi L-arginínu (metylovanými arginínovými zvyškami), z ktorých sa v plazme v najväčšej koncentrácii vyskytuje asymetrický dimetylgarginín (ADMA) (1).

Enzým dimetylgarginín dimetylaminohydroláza (DDAH) hydrolyzuje asymetricky metylované arginínové zvyšky, ktoré sú endogénne produkovanými inhibítormi všetkých troch izoformiem NO-syntázy. Keďže metylované arginínové zvyšky vznikajú proteolýzou najmä nukleárných proteínov, ktoré zohrávajú kľúčové úlohy v bunkovom jadre, koncentrácia metylarginínov závisí najmä od rýchlosti ich degradácie, teda od aktivity DDAH. DDAH je kľúčovým determinantom intracelulárnej koncentrácie metylarginínových rezíduí a teda faktorom, ktorý moduluje produkciu oxidu dusnatého *in vivo* (1, 2).

U cicavcov (vrátane človeka) sa vyskytujú dve izoformy dimetylgarginín dimetylaminohydrolázy (DDAH-1 a DDAH-2), ktoré majú zrejme podobné katalytické vlastnosti

Z ¹Ústavu pre bakalárske a magisterské štúdiá LF UPJŠ v Košiciach, ²III. internej kliniky LF UPJŠ a FNLP v Košiciach, ³I. internej kliniky LF UPJŠ a FNLP v Košiciach a ⁴Kliniky preventívnej medicíny a športového lekárstva LF UPJŠ a FNLP v Košiciach, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 4. apríla 2008; prijaté dňa 5. mája 2008

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Marek Pytliak, PhD., Ústav pre bakalárske a magisterské štúdiá, LF UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika, e-mail: m_pytliak@hotmail.com

a odlišujú sa tkanivovou distribúciou. DDAH-1 sa vyskytuje predovšetkým v tkanivách, v ktorých je exprimovaná neuronálna NOS (nNOS), kým DDAH-2 sa vyskytuje prevažne v husto vaskularizovaných tkanivách, kde je exprimovaná endotelová NOS (eNOS). Štruktúra DDAH bola počas evolúcie vysoko konzervovaná – aktívne miesto je uložené v centre pentaénu tvoreného piatimi $\beta\beta\beta$ motívmi rozloženými okolo pseudo-päťnásobnej osi (3). Katalytické miesto všetkých známych foriem DDAH (od baktérie po obidve ľudské izoformy) vytvára triáda aminokyselín (Cys, His a Asp alebo Glu). Aktívne miesto ľudskej DDAH vytvára triáda Cys-273, His-172 a Asp-126. Prítomnosť reaktívneho zvyšku cysteínu na pozícii 273 zvyšuje pravdepodobnosť, že aktivitu DDAH reguluje S-nitrozylácia tohto zvyšku priamo molekulou NO. Ide o potenciálny homeostatický mechanizmus kontroly tvorby NO negatívnou spätnou väzbou (4).

Farmakologická inhibícia alebo „knokoutovanie“ génu pre DDAH zvyšuje plazmatické aj intracelulárne koncentrácie asymetrického dimetylarginínu, ktorý je hlavným endogénnym inhibítorom NOS. Naopak, nadprodukcia DDAH má opačný efekt. Napriek povzbudivým výsledkom *in vitro* štúdií a štúdií na zvieracích modeloch, kedy farmakologická inhibícia alebo naopak heterológna nadprodukcia DDAH zapríčinili relatívne veľké zmeny koncentrácií ADMA, ktoré ovplyvnili produkciu NO, situácia u ľudí *in vivo* je oveľa menej jasná (5, 6).

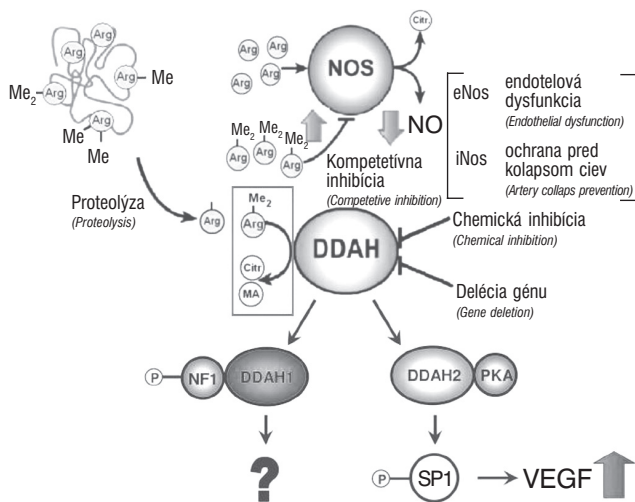
Okrem priamej inhibície eNOS s poklesom produkcie NO endotelom a prevahou vazokonstrikčne pôsobiacich mediátorov, má ADMA aj mnoho ďalších účinkov. Britskí autori použili model s myšami s knokoutovaným génom pre DDAH-1 (DDAH-1^{-/-}). DDAH-1^{-/-} myši krížili navzájom, čím získali potomstvo DDAH-1^{+/-} a DDAH-1^{+/+} myši v pomere 2 : 1. To znamená, že pre normálny vývoj je nevyhnutná aspoň jedna kópia génu pre DDAH a fenotyp DDAH-1^{-/-} umiera ešte *in utero* (7). DDAH-1^{+/-} myši sa vyvíjali normálne, ale delécia jednej alely pre DDAH spôsobila zvýšenie plazmatickej koncentrácie asymetrického dimetylarginínu priemerne o 0,2 – 0,6 $\mu\text{mol/l}$, čo je zvýšenie podobné ako u pacientov s početnými kardiovaskulárnymi rizikami. Pľúcne endotelové bunky DDAH-1^{+/-} myši vykazovali v kultúre signifikantne vyššiu produkciu ADMA a zníženú produkciu NO ako rovnaké bunky DDAH-1^{+/+} myši. Kultivácia buniek DDAH-1^{+/+} myši v médiu obsahujúcom inhibítory DDAH viedla k rovnakému poklesu produkcie NO. Pri DDAH-1^{+/-} myšiach sa zistila endotelová dysfunkcia v systémovej aj pľúcnej vaskulatúre. Cievky vykazovali zvýšenú kontraktilitu ako odpoveď na fenylefrín, redukovanú relaxáciu po acetylcholínovej alebo kalciovom ionofore A23187 a zvýšenú relaxáciu po pridaní nitroprusidu

sodného (NO-donor). Zníženie vazodilatačnej odpovede na acetylcholín v bunkách ciev DDAH-1^{+/-} myši alebo v normálnych bunkách kultivovaných v médiu s inhibítorom DDAH je reverzibilné po podaní L- ale nie D-arginínu (8, 9). Tieto nálezy jasne dokazujú, že zníženie aktivity DDAH a/alebo zvýšenie koncentrácie endogénneho asymetrického dimetylarginínu môže indukovať biochemický fenotyp, ktorý sa spája s vyšším kardiovaskulárnym rizikom.

Zaujímavý je aj časový priebeh inhibície DDAH, pretože môže poskytnúť náhľad do funkčnej kinetiky tejto metabolickej cesty. Na rozdiel od takmer okamžitého efektu priamych inhibítorov NOS, inhibícia DDAH vedie k postupne sa vyvíjajúcemu účinku, ktorý dosiahne maximum až po niekoľkých minútach DDAH inhibície. Tento nález zodpovedá predpokladom, že neustála nízka produkcia ADMA (ako produktu proteínového katabolizmu) sa udržiava pod koncentráciou spúšťajúcou inhibíciu NOS práve aktivitou DDAH. Po inhibícii DDAH dochádza k pozvoľnej akumulácii asymetrického dimetylarginínu až po dosiahnutie koncentrácie postačujúcej k supresii NO-syntázy (10, 11).

Pri sledovaní hemodynamických účinkov haploinsuficiencie DDAH-1 sa v jednej štúdií zistilo signifikantné zvýšenie stredného arteriálneho tlaku, periférnej cievnej rezistencie, srdcového výdaja a tlaku v pravej komore u DDAH-1^{+/-} myši v porovnaní s divokým typom DDAH-1^{+/+}. Farmakologická inhibícia dimetylarginínu dimetylhydrolázou potvrdila tieto nálezy – tlak v malom obehu DDAH-1^{+/+} myši sa signifikantne zvýšil 30 minút po intravenóznom podaní inhibítora DDAH-1 – metylesteru N^G-(2-metoxetyl)arginínu (12).

Autori inej štúdie použili transgénové myši, ktoré produkovali zvýšené množstvá ľudskej DDAH-1. U týchto myši zaznamenali zrýchlenie srdcovej akcie približne o 10 %, čo pravdepodobne súviselo s aktiváciou sympatika, indukovanou poklesom systémovej rezistencie. Zrýchlenie srdcovej frekvencie spevádzal 10 % pokles vývrhového objemu, takže v konečnom dôsledku minútový objem zostal zachovaný na rovnakej úrovni. Redukcia vývrhového objemu vznikla pravdepodobne skrátením času diastolického plnenia komôr a znížením venózneho návratu v dôsledku zvýšenej poddajnosti venózneho riečiska pri zvýšenej produkcii NO u transgenických myši. Zvýšenie srdcovej frekvencie môže byť v tomto prípade aj kompenzáciou zníženej kontraktility komôr. Je známe, že NO v submilimolárnych množstvách redukuje kontraktilitu myokardu. Preto aj u pacientov so srdcovým zlyhaním má aktivácia induktibilnej formy NOS signifikantný účinok na systolickú aj diastolickú funkciu (13, 14). Aj keď má NO priamy efekt na sinoatriálny uzol (znižuje



Obrázok 1 Význam DDAH pri regulácii produkcie NO a v procese angioneogenézy

Figure 1 Role of DDAH in the regulation of NO production and in angiogenesis
 Arg – arginín (Arginine), Arg-M – metylovaný arginín (Methylated arginine), Arg-Me₂ – dimetylarginín (Dimethylarginine), DDAH – dimetylarginín dimetylaminohydroláza (Dimethylarginine dimethylaminohydrolase), Citr. – citrulín (Citrulline), MA – metylamín (Methylamine), NF-1 – neurofibromín-1 (Neurofibromin-1), NOS – NO-syntáza (NO-synthase), PKA – proteínkináza A (Protein kinase A), Sp1 – transkripčný faktor (Transcription factor 1), VEGF – vaskulárny endotelový rastový faktor (Vascular endothelial growth factor)

automaticitu a tým znižuje srdcovú frekvenciu), v tomto prípade prevládala aktivácia sympatika so zvýšením srdcovej frekvencie. Jedným z možných mechanizmov, ktorý sa spolupodieľal na tomto efekte, je pravdepodobne miestna inhibícia DDAH v dôsledku zvýšenej lokálnej tvorby NO, ktorá prebieha N-nitrozyláciou Cys-273 zvyšku v molekule dimetylarginín dimetylaminohydrolázy (15). Zaujímavým zistením bolo, že endotelové bunky z aorty DDAH transgénových myší nevykazovali zvýšenú aktivitu NOS. Dôležité je si uvedomiť, že hlavným podnetom na expresiu NOS v aorte je strihové napätie, teda faktor chýbajúci v podmienkach *in vitro* (16). Nadprodukcia DDAH viedla okrem toho k zvýšenej aktivite NOS v endotelových bunkách, zníženým plazmatickým koncentráciám ADMA a k zníženiu systémového tlaku v dôsledku zníženej periférnej vaskulárnej rezistencie (13).

Aktivita DDAH a koncentrácie ADMA zohrávajú úlohy aj v procese angioneogenézy a pri migrácii endotelových buniek. Zníženie koncentrácie ADMA alebo nadprodukcia DDAH pri transgénovom prenose viedla *in vitro* k zrýchleniu tvorby kapilár v líniiach ľudských endotelových buniek. Naopak, farmakologická inhibícia DDAH inhibuje kapilárnu formáciu (17). Mechanizmus,

ktorým ADMA ovplyvňuje angioneogenézu, nie je zatiaľ úplne objasnený, zdá sa však, že cesta DDAH/ADMA ovplyvňuje motilitu endotelových buniek. Motilita endotelových buniek závisí od produkcie NO, pričom niektorí autori uvádzajú, že NO pohyblivosť endotelových buniek zvyšuje (18), iní, že ju inhibuje (19). Oxid dusnatý spúšťa rozličné intracelulárne signálne kaskády, vrátane fosforylácie serínových zvyškov proteínov proteínkinázou G (PKG), S-nitrozylácie cieľových bielkovín alebo adenozín 5'-difosfát ribozylácie (20 – 22). NO tiež ovplyvňuje expresiu a aktivitu Rho GTP-ázy, ktorá je kľúčovým regulátorom bunkovej motility a aktínového cytoskeletu. Expresia RhoA mRNA sa v endotelových bunkách z potkanej aorty pozitívne regulovala NO/PKG cestou (23). Exogénny aj endogénny asymetrický dimetylarginín indukuje tvorbu stresových fibríl, čím sa zvyšuje adhezi-vita a znižuje motilita endotelových buniek. Tento efekt je sprostredkovaný NO-mediovanou aktiváciou RhoA a Rho kinázy. Nadprodukcia DDAH, ktorá vedie k poklesu ADMA, vedie aj k úprave bunkového fenotypu a bunkovej motility (24).

Zaujímavým nálezom viacerých štúdií bolo, že zvýšením koncentrácie ADMA o 0,1 $\mu\text{mol/l}$ sa zvyšuje výskyt kardiovaskulárnych príhod až o 20 %. Otázne je, či takáto malá zmena koncentrácie ADMA môže spôsobiť takú výraznú inhibíciu produkcie NO. Hodnota IC₅₀ ADMA na NOS sa pohybuje rádovo v desiatkach $\mu\text{mol/l}$, v závislosti od koncentrácie prevažujúceho L-arginínu. Keďže koncentrácie L-arginínu zriedkavo klesnú pod 100 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrácie ADMA sa pohybujú v rozmedzí 0,3 – 1,0 $\mu\text{mol/l}$, je nepravdepodobné, že by zvýšenie koncentrácie asymetrického dimetylarginínu o 0,1 $\mu\text{mol/l}$ malo taký výrazný efekt na metabolizmus NO. Aj keď intracelulárne koncentrácie ADMA sú oveľa vyššie, zdá sa, že ADMA a DDAH majú aj účinky nezávislé od NO (25).

Patofyziologické koncentrácie ADMA môžu regulovať expresiu génov NO-nezávislým mechanizmom. Nadprodukcia DDAH ovplyvňuje expresiu génu pre vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF – vascular endothelial growth factor), a to priamou väzbou DDAH-2 na proteínkinázu A (PKA) a čiastočnou fosforyláciou transkripčného faktora Sp1. Fosforylovaný Sp-1 sa importuje do bunkového jadra a aktivuje transkripciu VEGF (26). Podobne DDAH-1 sa *in vitro* priamo viaže na neurofibromín-1 (NF-1), regulátor Ras-cesty. Väzba DDAH-1 na NF-1 viedla k fosforylácii NF-1 cestou proteínkinázy A (obrázok 1). Fibroblasty NF-1^{-/-} myší prekvapujúco vykazovali zvýšenú aktivitu DDAH, čo podporuje hypotézu, že aktivitu DDAH možno regulovať väzbou NF-1 (27).

Záver

Metylarginíny, najmä ADMA, sú endogénnymi regulátormi NOS aktivity. Koncentrácie ADMA sú silným a nezávislým prediktorom mnohých kardiovaskulárnych ochorení a sú zvýšené aj pri iných situáciách spojených so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom (diabetes mellitus, hypercholesterolémia a pod.). Koncentrácie asymetrického dimetylarginínu čiastočne odrážajú rozdiely v expresii DDAH proteínov a na alterácii aktivity DDAH sa pravdepodobne podieľa NO (cestou N-nitrozylácie cysteínového zvyšku v molekule DDAH), ale aj NO-nezávislá cesta – priama väzba na bielkoviny. Znížená aktivita DDAH s následným zvýšením koncentrácií asymetrického dimetylarginínu a inhibíciou produkcie NO vedú k promócií aterosklerotického procesu. Terapeutická modulácia koncentrácií ADMA, pravdepodobne farmaceutickou alebo genetickou modifikáciou aktivity dimetylarginín dimetylaminohydrolázy, môže teda predstavovať novú stratégiu liečby kardiovaskulárnych ochorení.

Literatúra

1. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1411–1416.
2. McBride AE, Silver PA. State of arg: protein methylation as arginine comes of age. *Cell* 2001;106:5–8.
3. Murray-Rust J, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 2001;8:679–683.
4. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, et al. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and DDAH. *Proc. Natl Acad Sci* 2002;99:13527–13532.
5. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842–1847.
6. Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and NG, NG- and NG,NG-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:325–329.
7. Smith CL, Anthony S, Hubank M, et al. Effects of ADMA upon gene expression: an insight into pathophysiological significance of raised plasma ADMA. *PLoS Med* 2005;2:264–265.
8. Leiper J, Nandi M, Torondel B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 2007;13:198–203.
9. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, et al. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987–992.
10. Rossiter S. Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Med Chem* 2005;48:4670–4678.
11. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:939–950.
12. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108:3042–3047.
13. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996;93:1087–1094.
14. Vejstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localisation in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1215–1223.
15. Kojda G, Kottenberg K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res* 1999;41:514–523.
16. Cooke JP, Rossitch E, Andon N, et al. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous vasodilator. *J Clin Invest* 1991;88:1663–1671.
17. Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler* 2003;(Suppl.)4:S53–S60.
18. Kawasaki K, Smith RS, Jr., Hsieh CM, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:5726–5737.
19. Lau YT, Ma WC. Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:670–674.
20. Yaroslavskiy BB, Zhang Y, Kalla SE, et al. NO-dependent osteoclast motility: reliance on cGMP-dependent protein kinase I and VASP. *J Cell Sci* 2005;118:5479–5487.
21. Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. *Am J Cell Physiol* 2000;279:C806–C812.
22. Clancy R, Leszczynska J, Amin A, et al. Nitric oxide stimulates ADP-ribosylation of actin in association with the inhibition of actin polymerization in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1995;58:196–202.
23. Seazeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, et al. RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem* 2003;278:9472–9480.
24. Hou Y, Ye R, Browning DD. Activation of small GTPase Rac1 by cGMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* 2004;16:1061–1069.
25. Leiper J, Vallance P. New tricks from an old dog: Nitric oxide-independent effects of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1419–1420.
26. Hasegawa K, Wakiko S, Tanaka T, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1488–1494.
27. Tokuo H, Yunoue S, Feng L, et al. Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *FEBS Lett* 2001;494:48–53.