

Aus dem Institut für Molekulare Medizin,
Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Prof. Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachofen

Zur Rolle und Bedeutung des Regulationsmusters der
induzierbaren NO-Synthase (NOS 2) und der Arginase 1 nach
proinflammatorischer Zytokinstimulation in humanen
Leberzelllinien (HepG2, AKN) und in primären
Rattenhepatozyten.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Guido Alois Lerzynski

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Victoria Kolb-Bachofen

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Für meine Mutter

Danksagungen

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachofen für die Überlassung des Themas und die beständige Betreuung. Von Ihren konstruktiven wie wissenschaftlichen Hilfestellungen und Ihren umfassenden Kenntnissen im Bereich meines Forschungsgebiets konnte ich stets profitieren.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke gilt mein Dank für die kompetente Hilfe in biochemischen Fragestellungen.

Frau Ulla Lammersen danke ich für Ihre hohen Ansprüche an Zellkultur und Laborhygiene, welche die Arbeit im Labor qualitativ hochwertig machte.

Frau Marija Lentzen danke ich für die bereitwillige Hilfe bei Problemen mit den Labortechniken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Eine Einführung zum Stickstoffmonoxid (NO)	6
1.2. Die Familie der Stickstoffmonoxid – Synthasen (NOS)	6
1.2.1. Molekulare Regulation der induzierbaren NO-Synthase	8
1.3. Antagonisten der NO-Synthasen und der NO-Wirkung	9
1.4. Molekulare Wirkungen von NO	10
1.5. L-Arginin und dessen Transport in die Zelle	12
1.6. Die Arginasen und deren Interaktion mit der NOS 2	13
1.7. Die Rolle von NO im Rahmen von Entzündungen	14
1.8. Die Rolle von NO im Leberstoffwechsel	15
1.9. Ziele dieser Arbeit	16
2. Materialien und Methoden	17
2.1. Materialien	17
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.2. Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur	18
2.1.3. Zytokine	19
2.1.4. Antikörper	20
2.1.5. Primer	21
2.1.6. Materialien für die Reverse Transkription und die PCR	22
2.1.7. Geräte	22
2.1.8. Einwegartikel für die Zellkultur	23
2.1.9. Tiere	23
2.1.10. Zellen	24
2.2. Methoden	24
2.2.1. Kultivierung von HepG2- und AKN-Zelllinien	24
2.2.2. Trypsinierung adhärenter Zellen	24
2.2.3. Auftauen eingefrorener Zellen	24
2.2.4. Isolation und Kultivierung von primären Rattenhepatozyten	25
2.2.5. Kultivierung der Rattenhepatozyten	26
2.2.6. Aktivierung von Zellen und Inkubation mit L-Arginin-freiem Medium	26
2.2.7. Zugabe von Aminosäuren zum Medium	27

2.2.8. Isolation der RNA	27
2.2.9. Reverse Transkription	28
2.2.10. RT-PCR	29
2.2.11. Nachweis der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese	30
2.2.12. Nitritbestimmung nach Griess	31
2.2.13. Harnstoff-Bestimmung	31
2.2.14. Western Blot Verfahren	32
2.2.15. Statistische Auswertung	34
3. Resultate	35
3.1. Charakterisierung der humanen Leberzelllinien	35
3.1.1. HepG2-Zellen	35
3.1.2. AKN-Zellen	44
3.2. Charakterisierung der Rattenhepatozyten	50
3.3. Inhibition der NOS 2 bei Rattenhepatozyten	55
3.4. Variation der L-Arginin-Konzentration im Kulturmedium von Rattenhepatozyten	55
3.5. Modulation der Nitrit- und Harnstoffproduktion in Rattenhepatozyten durch Zugabe von Aminosäuren	57
3.5.1. Inhibition der Arginase mit L-Valin	57
3.5.2. Kompetitive Inhibition des L-Arginin-Transports mit L- Lysin	59
3.5.3. Produkthemmung der Arginase-Aktivität durch L-Ornithin	61
3.5.4. Kombination von Produkthemmung und Transportkompetition durch kombinierte Gabe von L-Lysin und L-Ornithin	63
3.5.5. Inhibition der NOS 2 durch L-Arginin-Analoga (L-NIO, L-NAME)	65
4. Diskussion	68
5. Literaturverzeichnis	79
6. Abkürzungen	89
7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	90
8. Zusammenfassung	92
9. Lebenslauf	92

1. Einleitung

1.1. *Eine Einführung zum Stickstoffmonoxid (NO)*

Für mehr als 100 Jahre wurde Nitroglycerin als Medikament zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzt, ohne dass man den genauen Wirkmechanismus kannte. Erst seit den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts weiß man, dass es durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) über die Guanylatzyklase und der Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (c-GMP) zu einer Dilatation der glatten Muskulatur und somit zu einer verbesserten Durchblutung kommt. Für diese Erkenntnisse wurde im Jahre 1998 der Nobelpreis für Medizin an Robert F. Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad verliehen [1].

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges freies Radikal, das physiologische Prozesse in jedem Gewebe und Organ beeinflusst. Das Molekül kann mit Hilfe der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet werden. Die physiologische Funktion von NO wird in vielen Bereichen durch eine direkte Häm-abhängige Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und der daraus folgenden Anreicherung von intrazellulärem c-GMP erreicht. Darüber hinaus wirken NO und seine reaktiven Metabolite durch eine S-Nitrosylierung von Thiol-Gruppen oder Nitrierung von randständigen Tyrosin-Gruppen einiger Proteine. Insgesamt ist das Molekül an einem breiten Spektrum von Aufgaben wie der Neurotransmission, der Blutgerinnung, der Blutdruckregulation und der Immunregulation beteiligt, die sowohl schützend als auch schädigend sein können.

1.2. *Die Familie der Stickstoffmonoxid – Synthasen (NOS)*

Die Enzymgruppe der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) besteht aus drei Isoformen. Dabei wird unter Sauerstoffverbrauch aus L-Arginin enantiomerspezifisch sowie äquimolar NO und L-Citrullin produziert. Die NOS 1 oder nNOS wurde zunächst aus Neuronen kloniert, später fand man sie auch in anderen Zelltypen wie dem Skelettmuskel, Endometrium, neutrophilen Leukozyten, Keratinozyten, respiratorischen und gastrointestinalen Epithel. Ebenso wie die NOS 3 oder eNOS,

die in Endothelzellen aber auch in anderen Zelltypen vorkommt, ist sie konstitutiv exprimiert. Aus Makrophagen wurde eine weitere NOS, die NOS 2 oder iNOS isoliert, die nicht konstitutiv sondern erst nach proinflammatorischen Stimuli (z.B. LPS) exprimiert wird [2, 3].

Alle NOS Isoformen sind Homodimere aus 161 (NOS 1), 131 (NOS 2), bzw. 133kDa (NOS 3) großen Untereinheiten mit Bindungsstellen für Flavinadeninindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Häm, (Calcium-) Calmodulin und L-Arginin. Die Enzyme unterscheiden sich jedoch in ihrer Dimerisierung. Bei der NOS 1 und der NOS 3 wird das inaktive Dimer erst durch die Bindung von Calcium-Calmodulin aktiv, während die inaktiven Monomere der NOS 2, die Calmodulin irreversibel binden, nach Substratbindung dimerisieren und aktiv werden (Abb. 1). Die konstitutiven NOS (NOS 1 und 3) sind Calcium abhängig und können durch schnelle kurze Syntheseaktivitäten pulsatile Mengen an NO freisetzen, während die NOS 2 nach Induktion NO über einen längeren Zeitraum produziert [2,4].

Im aktiven NOS 2 Protein, in dem die N-terminale Oxygenase-Domäne die Bindungsstellen für Häm und Tetrahydrobiopterin enthält, ist L-Arginin über eine Calmodulin-Bindungsstelle mit der C-terminalen Reduktase-Domäne verbunden, in der ebenfalls die Bindungsstellen der Ko-Faktoren FMN, FAD und NADPH lokalisiert sind [2].

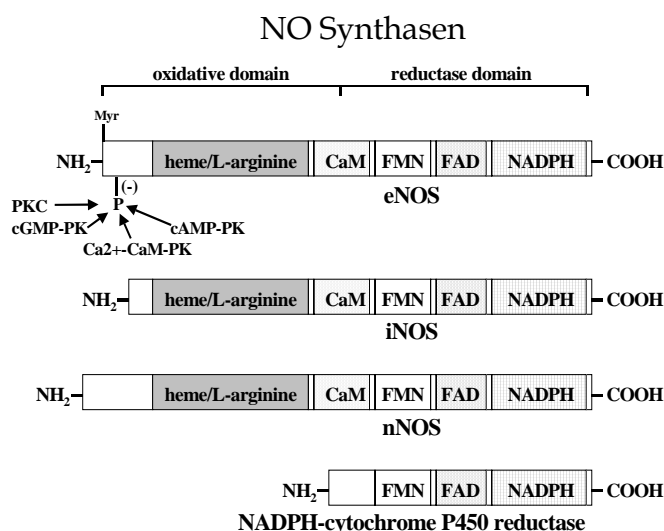


Abbildung 1. Schematische Strukturen von NOS 3 (eNOS), NOS 2 (iNOS) und NOS 1 (nNOS). Beschrieben sind die Bindungsstellen für NADPH, FAD und FMN in den carboxyl-terminalen Domänen; daneben die Bindungsstellen für Calmodulin (CaM) und Häm/L-Arginin am NH₂-Ende, sowie die Bindungsstellen für die Proteinphosphorylierung (P) und Myristoylierung (Myr). Die Phosphorylierung kommt mittels PKC und Ca²⁺-, CaM-, cGMP-, und cAMP-abhängigen Kinasen zustande [2, 3].

1.2.1. Molekulare Regulation der induzierbaren NO-Synthase

Das humane NOS 2 Gen liegt auf Chromosom 17 an der Position 17cen-q11.2 [5], weist eine Länge von ca. 37 kb auf und besteht aus 26 Exons und 25 Introns. Kloniert besteht die humane cDNA aus insgesamt 4145 Basenpaaren, mit einem offenen Leseraster von 3459 Basenpaaren, welches ein Protein von 1153 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 131 kDa kodiert [2].

Die Aktivität der Calcium-unabhängigen und induzierbaren NOS 2 wird fast ausschließlich transkriptional kontrolliert. Analysen der Sequenz der humanen NOS 2 Promotoren zeigen mehrere Zytokin-responsible Elemente und Konsensus-Sequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Innerhalb der ersten 400 Basenpaare sind drei Interferon- γ -responsible Elemente (γ -IRE) sowie eine NF- κ B Bindestelle gefunden worden, die für die induzierbare Genexpression mit verantwortlich sind [2, 6]. Inwieweit die einzelnen Promotorsequenzen funktionell von Bedeutung sind, ist noch unklar. Am murinen NOS 2-Promotor konnte gezeigt werden, dass ein 1,7kb Segment der 5'-Region LPS- und Zytokin-responsible Elemente enthält, durch die eine Induzierbarkeit mit LPS und IFN- γ nachgewiesen werden konnte [7]. Im Vergleich dazu ergeben sich in der Regulation des humanen NOS 2-Promotors gravierende Unterschiede, da Zytokin-responsible Segmente weiter 5'-wärts zwischen -3,8 und 5,8kb, -5,8 und 7,0kb sowie -7,0 und 16,0kb identifiziert werden konnten. In den noch weiter 5'-wärts liegenden Regionen konnten keine Zytokin-responsiblen Promotoraktivitäten nachgewiesen werden [5]. Neben den proinflammatorischen Zytokinen wird eine NOS 2-Induktion durch Viren, Phorbolster, Sauerstoffradikale, UV-Licht, und einige Medikamente erreicht. Signalverstärkend wirken auch Wachstumsfaktoren (GM-CSF), Hitzeschockproteine und verschiedene Toxine (Cholera- und Pertussistoxin) [4].

Das Antwortprofil der NOS 2-Induktion durch Zytokine ist nicht nur für die NOS 2-exprimierende Zellart, sondern auch innerhalb der Zellart für das jeweilige Organ spezifisch. So kann z.B. durch TNF- α eine Induktion in Rattenhepatozyten ausgelöst werden, wohingegen in Aortenendothelzellen durch TNF- α allein keine Induktion ausgelöst wird [8-10].

Eine Inhibition des NOS 2-Promotors kann durch TGF- β und Glukokortikoide erreicht werden [11]. In humanen Hepatozyten wurde nach Zugabe von Dexamethason eine verringerte NOS 2-Transkription gefunden. Dabei kommt es zu einer Inhibition der

Zytokin-stimulierten NF- κ B Aktivität in Folge der Dexamethason-induzierten Erhöhung von I- κ B [12].

Darüber hinaus unterliegt die NOS 2 einer Reihe weiterer posttranskriptionaler, translationaler und posttranslationaler Kontrollmechanismen. So induziert IFN- γ zusammen mit LPS nicht nur die NOS 2-Expression, sondern stabilisiert auch ihre mRNA. IL-4 und TGF-beta1 bewirken hingegen auf mRNA- und Proteinebene eine Destabilisierung [13, 14].

1.3. Antagonisten der NO-Synthesen und der NO-Wirkung

Durch eine Reihe von körpereigenen und synthetisch-hergestellten Inhibitoren der löslichen Guanylatzyklase und der NO-Synthesen lassen sich die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen von NO modulieren. Zu den natürlichen, körpereigenen Antagonisten zählen die an Häm- bzw. SH-Gruppen gebundenen Fe²⁺-Ionen [15], Katecholamine [16], Thrombin, Endothelin I [17], L-Arginin-Derivate wie das asymmetrische Dimethyl-L-Arginin [2], Katalase [18] und Proteine mit Thiolbestandteilen [19].

Zu den wichtigsten synthetischen Hemmsubstanzen der NOS zählen verschiedene mit Guanidino-Gruppen-substituierte L-Arginin-Derivate. Diese substratanalogen Inhibitoren bewirken in Anwesenheit von L-Arginin eine kompetitive Hemmung der NOS. In Abwesenheit von L-Arginin kommt es dagegen zur Inhibition mittels einer irreversiblen, kovalenten Bindung dieser Substanzen an das Enzym [2]. Die N^G-L-Arginin-Derivat-bedingte Hemmung der NO-Synthesen lässt sich durch einen Überschuss von L-Arginin wieder aufheben. In Bezug auf ihre inhibitorische Wirkung besitzen manche L-Arginin-Derivate keine eindeutige Spezifität für eine bestimmte Isoform der NOS. Die beiden konstitutiven und die induzierbare NOS zeigen jedoch charakteristische Unterschiede in der Konzentrationsabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung der verschiedenen L-Arginin-Analoga, wobei das N^G-Nitro-L-Arginin und der N^G-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) die größte relative Spezifität für die inhibitorische Leistung der konstitutiven NOS zeigen [2]. Dem L-Arginin-Derivat N^G-Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMA) fällt insofern eine besondere Bedeutung zu, als dass es ein potenter Inhibitor sowohl der konstitutiven als auch der induzierbaren NOS ist

[2]. Als spezifisch für die Inhibition der NOS 2 wurde N⁵-iminoethyl-L-ornithin (L-NIO) beschrieben [20].

1.4. Molekulare Wirkungen von NO

Stickstoffmonoxid ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt und spielt bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine wichtige Rolle:

Durch die vasorelaxierende Wirkung leistet NO einen entscheidenden Beitrag zur Blutdruckregulation, wobei das neuronale System über Acetylcholin, humorale Faktoren über Kinine, mechanische Effekte durch Scherkräfte und der lokale Sauerstoffpartialdruck als Regulationsmechanismen dienen [21, 22]. Daneben wird durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion eine physiologische Hämoperfusion gewährleistet [22].

NO ist als endogener Inhibitor der leukozytären Adhäsion auch anti-inflammatorisch wirksam [23]. Die Hemmung der lymphozytären Proliferation und die Regulation der MHC-Klasse-II-Antigene verhindern eine Überstimulation des Immunsystems [24]. Darüber hinaus werden für NO Effektorfunktionen in der antimikrobiellen und antineoplastischen Abwehr beschrieben [23,25].

Im zentralen und peripheren Nervensystem dient NO als Signalmolekül und im peripheren nicht-adrenergen-nicht-cholinergen (NANC) Nervensystem wird das Molekül als Neurotransmitter verwendet. Funktionen der Synaptogenese, der Gedächtnisbildung, der neuroendokrinen Sekretion, der olfaktorischen und visuellen Signaltransduktion werden im zentralen Nervensystem durch NO bedingt [26-28].

In verschiedenen anderen Regulationssystemen wie denen der Niere, des Magen-Darm-Traktes, der Lunge, der Haut und der endokrinen Organe ist Stickstoffmonoxid ebenfalls von zentraler Bedeutung [29-32].

Neben den Regulationsfunktionen ist NO auch an der Entstehung von entzündlichen, TH-1 assoziierten Erkrankungen beteiligt; so ist das von Makrophagen und Endothelzellen gebildete NO maßgeblich für die Hypotension beim Zytokin-induzierten Schock verantwortlich [33]. Während früher Pathogenese-Stadien des Diabetes mellitus Typ I ist NO an der β -Zell-Zerstörung mitbeteiligt. NO reagiert auf subzellulärer Ebene mit Proteinen des Energiehaushaltes, der Replikation und Proteinbiosynthese, der Signalübertragung und mit Nukleinsäuren. Der

Energiestoffwechsel wird verändert durch die Reaktion von NO mit Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Enzymen wie z.B. der Aconitase des Zitratzyklus, der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase und der Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase der mitochondrialen Atmungskette.

Darüber hinaus kommt es durch Modifikation von Transkriptionsfaktoren des Zink-Finger-Typs zur Verdrängung von komplexierten Zn^{2+} -Ionen und damit zur Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors mit Verlust der DNA-Bindung [34].

Direkte Reaktionen von NO mit Nukleinsäuren führen zur Desaminierung von Purin- und Pyrimidinbasen mit der Folge von Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Durch diese Wechselwirkungen besitzt NO mutagene Potenz, die bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen könnte [35].

Einerseits induziert das NO-Radikal den Zelltod über Apoptose und Nekrose [36]. Dabei kommt es durch NO-medierte-DNA-Strangbrüche zur Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), eines an der DNA-Reparatur beteiligten Enzyms, und damit zu einem Verbrauch von ATP und NAD^+ , welches in verschiedenen Zelltypen den Mechanismus zum Zelltod bedingt [37] (Abb. 2). Andererseits werden in der Literatur auch Belege für eine antiapoptotische Wirkung von NO angeführt [38].

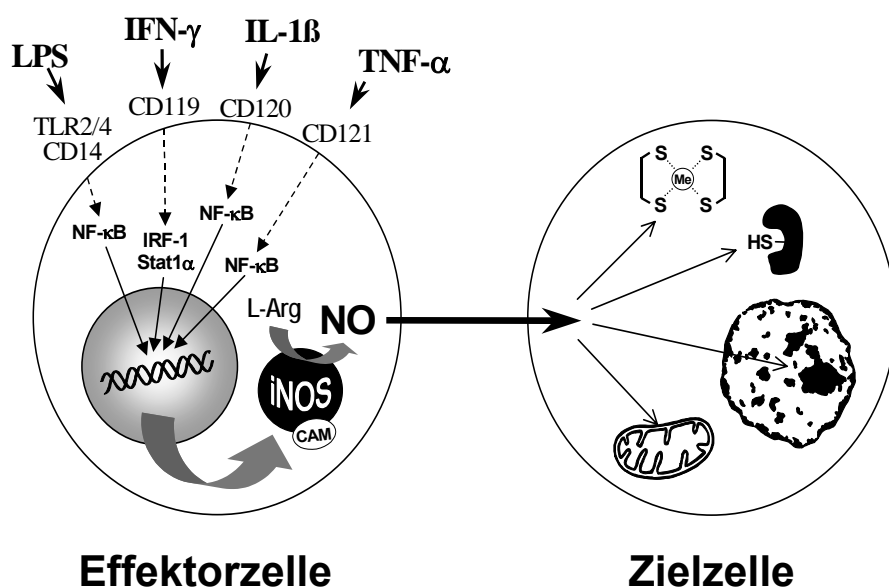


Abbildung 2. Zelluläre Interaktionen von NOS 2 produziertem NO. NO der NOS 2 wird im Zytosol der Zelle synthetisiert und auf unbekannte Weise aus der Zelle transportiert. Durch den NO- Radikalfänger Hämoglobin wirkt NO hauptsächlich parakrin. In den Zielzellen beeinflusst NO Transportproteine, Ionenkanäle und das Plasmamembranpotential, um die mitochondriale Atmung und das Membranpotential zu blockieren, um Metall-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster, Zn-S-Cluster) in Proteinen zu zerstören, um Enzyme mit freien SH-Gruppen am bzw. in der Nähe des aktiven Zentrums zu blockieren und um den DNA-Schaden, der zu einer Aktivierung von der Poly(ADP-Ribose)Polymerase im Zellkern führt, zu medieren. [2-4, 25].

1.5. L-Arginin und dessen Transport in die Zelle

L-Arginin ist eine kationische Aminosäure, die physiologisches Ausgangsprodukt für die Synthese von Stickstoffmonoxid durch die NOS 2 ist. Da sie in vielen Säugetieren unter Bedingungen hohen Bedarfs (z.B. Wachstum, Wundheilung) nicht hinreichend synthetisiert werden kann, wird sie als ‚semi-essentiell‘ bezeichnet. Creatin, Harnstoff, Agmatin und Polyamine werden ausgehend von L-Arginin synthetisiert. Des Weiteren wird L-Arginin auch bei der Produktion von Pyrimidinbasen und Proteinen benötigt [39, 40].

L-Arginin kann aus L-Ornithin über L-Citrullin-Verbrauch im Harnstoffzyklus synthetisiert werden, dabei wird L-Ornithin durch die Verstoffwechselung von L-Arginin mittels der Arginasen umgesetzt. Ebenso kann L-Ornithin auch aus L-Glutamat und L-Prolin hergestellt werden. Das in der Leber synthetisierte L-Arginin wird vor Ort metabolisiert und trägt nur in geringem Maße zum Plasma-L-Arginin-Spiegel bei. Der Plasma-L-Arginin-Spiegel wird einerseits durch die tägliche Ernährung aufrecht gehalten, andererseits aber auch durch die Synthese von L-Arginin und L-Citrullin im Dünndarm und in den Nierentubuli [39-41]. Zellen von Säugetieren müssen in der Lage sein kationische Aminosäuren mit der Umgebung auszutauschen. Da die Zellmembran undurchlässig ist für polare Moleküle werden spezielle Transporter in der Zellmembran benötigt, die diesen Austausch erleichtern. Diese kationischen Aminosäuretransportersysteme (γ^+ , CAT) transportieren neben L-Arginin auch L-Lysin und L-Ornithin [42]. Die Existenz von kationischen Aminosäuretransportern wurde bereits vor einigen Jahren erkannt. Aufgrund ihrer Komplexität wurden diese als Transportsysteme zusammengefasst. In den meisten Zellen ist der Transport von kationischen Aminosäuren energieabhängig mit einem erleichterten Austausch der Substrate zwischen intrazellulären und extrazellulären Kompartimenten über das Membranpotential [43, 44]. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass L-Arginin mindestens über sechs verschiedene Transportsysteme mit anderen kationischen Aminosäuren und kationischen NOS 2 Inhibitoren in die Zelle gelangt, von denen fünf Na^+ abhängig sind [45]. Die beiden wichtigsten Transporter für die Leberzellen von Ratte und Mensch sind CAT 1 und CAT 2B, die beide konstitutiv in Hepatozyten exprimiert werden [42,46].

Durch den wenig spezifischen Transport ist es möglich, dass Substrate, die keinen direkten Effekt auf die NOS-Aktivität haben, diese dennoch beeinflussen können, da

sie zusammen mit L-Arginin denselben Transporter beanspruchen. Daher können diese Substrate Auswirkungen auf die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration haben. Demzufolge wird postuliert, dass CAT-Proteine wichtige Ansatzpunkte darstellen, um die Substratversorgung für die NOS zu manipulieren [42].

1.6. Die Arginasen und deren Interaktion mit der NOS 2

L-Arginin ist eine Vorstufe in der Synthese von NO und Harnstoff sowie zahlreichen weiteren Proteinen. So wie die NOS 2 L-Arginin zu NO und L-Citrullin verstoffwechselt, so katalysiert die Arginase Harnstoff und L-Ornithin aus L-Arginin.

Die Arginase existiert in 2 Isoformen, der Leber-spezifischen Arginase 1 und der nicht-hepatischen Arginase 2. Die Gene von Ratte und Mensch sind 11,5 bzw. 12 kb lang und das menschliche Gen ist auf dem Chromosom 6q23 kodiert. Die hepatische Arginase 1 ist Teil des Harnstoffzyklus, der zur Entgiftung und Ausscheidung von wasserlöslichem Harnstoff führt; Arginase 2 kommt in den meisten anderen Zelltypen vor und dient dort der Polyamin- und Proteinbiosynthese [46,47]. Erstere befindet sich im Zytosol der Zelle, wohingegen die Arginase 2 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist [48,49].

Die Kompetition der NOS 2 und der Arginase um das Substrat L-Arginin hat in der Literatur zu vielen, zum Teil kontrovers diskutierten Ergebnissen geführt. Es wurde sowohl eine Interaktion als auch eine vollständige Unabhängigkeit der Enzyme voneinander diskutiert. Morris et al [48] haben an Makrophagen die Expression von NOS 2 und Arginase untersucht und zeigten, dass die Arginase-Expression unabhängig von der NOS 2-Expression ist. Einerseits konnte die Stimulation der NOS 2, jedoch nicht die der Arginase, durch IFN- γ induziert werden; andererseits reduzierte Dexamethason die Expression der Arginase ohne Einfluss auf die NOS 2. Die Regulation und das Interaktionsmuster von NOS 2 und Arginase 1 sind hoch komplex. Neben den unterschiedlichen Regulationsmechanismen der beiden Enzyme sind auch die biochemischen Enzymparameter von Bedeutung. Knowles und Moncada [50] beschrieben für die Arginase eine maximale Aktivität von 27/nmol/min/mg Protein und für die NOS 2 einen Wert von 3,2pmol/min/mg Protein. Zwischen den beiden Werten liegt der Faktor 10.000. Bei einem K_m -Wert der NOS 2 für L-Arginin von 1-20 μ M arbeitet das Enzym bei intrazellulären L-Arginin-

Konzentrationen von 50-200 μ M mit einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit. Ein Abfall der intrazellulären L-Arginin-Konzentration würde zu einem limitierenden Faktor für die NOS 2-Aktivität.

Der K_m -Wert der Arginase für L-Arginin liegt bei 10mM [51], so dass sich bei einer intrazellulären L-Arginin-Konzentration von 50-200 μ M eine maximale Aktivität von 14-54pmol/min/mg Protein ergibt.

1.7. Die Rolle von NO im Rahmen von Entzündungen

Die NO-Produktion bei entzündlichen Prozessen dient als Schutzmechanismus des Körpers gegenüber eindringenden Mikroorganismen. Vermutlich können aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten Mikroorganismen mit Hilfe NO-mediierter Prozesse abtöten. Bei einer entzündlichen Reaktion spielen Zytokine und Lipid-Mediatoren eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der NOS 2 [52].

Durch die Wirkung von NO werden über 1500 Gene in ihrer Expression moduliert [53,54]. Die Analyse dieser Gene sowie deren Klassifizierung nach Genfamilien deuten darauf hin, dass die NOS 2-Expression in Rattenhepatozyten generell eine anti-inflammatorische und antiapoptotische Rolle übernimmt. Ebenso bedeutend ist neben der Genregulation die Steuerung der Immunantwort. Untersuchungen an NOS 2-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass deren Th₁-Immunantwort wesentlich stärker ausfällt als die in Wildtyp-Tieren [55]. Somit zeigt NO ein hohes Potential, inflammatorische Prozesse zu regulieren und scheint daher ein entscheidender Mediator in der Th₁-Th₂ Balance immunmediierter Erkrankungen zu sein [25].

Neben der Schlüsselrolle der NOS 2 bei Immunreaktionen gibt es Erkenntnisse darüber, dass die NOS 2 neben der NOS 1 in dermalen Endothelzellen bei Entzündungen eine wichtige Funktion bei der Regulation des inflammatorischen Geschehens einnimmt.

Im Verlauf der Entzündung werden vaskuläre Endothelzellen aktiviert, wodurch die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (VCAM, ICAM-1-3) erfolgt [56]. Diese Adhäsionsmoleküle binden spezifisch Erkennungssequenzen an der Oberfläche von Monozyten und Lymphozyten. Immunzellen können durch das Endothel aus dem Blutstrom austreten und sich am inflammatorischen Geschehen

beteiligen. Die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wird durch die NOS-Aktivität moduliert, wobei die Inhibition der NOS die Adhäsion und Emigration von Leukozyten ermöglicht und Entzündungsprozesse begünstigt [25].

1.8. Die Rolle von NO im Leberstoffwechsel

NO kann in der Leber entweder in kleinen Mengen konstitutiv oder in großem Ausmaß unter entzündlichen Bedingungen gebildet werden [57]. Dabei wurde gezeigt, dass Hepatozyten, die über einen funktionsfähigen Harnstoffzyklus verfügen, im gleichen Maße wie nicht parenchymatöse Zellen der Leber NO produzieren können. Die geringen Mengen an NO in der Leber sind auf die Aktivität der konstitutiven NOS 3 zurückzuführen, die damit die Durchblutung der Leber aufrechterhalten kann und Schutz vor Entzündungen bietet. Die lang andauernde NO-Produktion wird durch die NOS 2 gewährleistet, die sich wahrscheinlich an der Immunabwehr gegen eindringende Pathogene beteiligt [58]. Die induzierbare NO-Produktion in der Leber nimmt eine wichtige Rolle bei der Modulation des Zelltods und der Schädigung von Gewebe ein. Abhängig von der Art der Pathologie kann die NOS 2-Aktivität entweder die Leber vor weiteren Schäden schützen oder aber die Schädigung forcieren. Eine toxische Wirkung von NO wurde beispielsweise beim Leberversagen nach LPS-induziertem Endotoxinschock beschrieben, wohingegen eine protektive Funktion von NO beim hämorrhagischen Schock nachgewiesen wurde [59-61].

Drei Mechanismen sind für die zytotoxischen Funktionen von NO verantwortlich: (1.) Die direkte Interaktion von NO mit mitochondrialen Bestandteilen führt z.B. zur Inaktivierung der Cytochrom c Oxidase mit der Folge einer mitochondrialen Dysfunktion. (2.) NO kann die DNA schädigen und somit den Zellzyklus beenden bzw. die Apoptose induzieren. (3.) NO kann direkt oder indirekt die c-Jun-N-terminalen Kinase aktivieren, die zum Zelltod führt.

Im Sinne einer schützenden Wirkung kann NO die Apoptose in Hepatozyten inhibieren [62-64]. Dabei bewirkt NO eine direkte Inhibition von Caspasen durch Redox-Modifikationen der Cystein-Residuen aktiver Caspase-Bindungsstellen [65]. Ebenso kann durch NO in Hepatozyten eine verstärkte Expression der Hämoxigenase 1 und dessen Enzymprodukt CO ausgelöst werden, welches durch

eine positive Feedback-Regulation auf die NOS 2 ebenfalls antiapoptotisch wirken kann [54].

Die Regenerationsfähigkeit der Leber nach Schädigungen beruht auf einer Interaktion von proinflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen [66]. Entzündungssignale sind dabei verantwortlich für die Stimulation der Regeneration. So initiieren unter anderem TNF- α und IL-6 die DNA-Synthese der Leber. Es wird daher diskutiert, dass die NOS 2-Induktion durch proinflammatorische Zytokine im Rahmen der Leberregeneration zytoprotektiv ist [67, 68]. Daneben spielt NO eine wichtige Rolle in der Genese der alkoholischen Hepatitis. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der NO-Synthese zu einer Verschlechterung und die Supplementierung mit L-Arginin zu einem verminderten Fortschreiten der alkoholischen Hepatitis führt [69]. Die genaue Rolle von NO im Rahmen der alkoholischen Hepatitis wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert [70].

Eine Schlüsselrolle von NO in der Leber ist die Regulation des sinusoidalen Blutflusses sowie des Gefäßtonus [71, 72]. Der sinusoidale Blutfluss verändert sich bei einer Störung des Gleichgewichts zwischen Vasokonstriktoren und NO. Dies führt zu einer Kontraktion der Sternzellen und zu einer sinusoidalen Konstriktion. Physiologische Konstriktionen der Sternzellen werden im Rahmen eines Endotoxin-Schocks beschrieben [73]. Eine Dysbalance durch eine veränderte NO-Produktion mit den beschriebenen Konsequenzen kann bei verschiedenen hepatischen Gefässerkrankungen wie der portalen Hypertension, des Ischämie/Reperfusionsschadens und der Venenverschlusserkrankung (veno-occlusive disease) eine Rolle spielen [74].

1.9. Ziele dieser Arbeit

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits beschrieben, werden der NO-Produktion in der Leber sowohl protektive als auch toxische Effekte zugeschrieben. Unter der Voraussetzung eines funktionsfähigen Harnstoffzyklus, bestimmter Aminosäuretransportsysteme und einer konstitutiv exprimierten Arginase 1 soll in dieser Arbeit die Substratverfügbarkeit von L-Arginin und deren Auswirkung auf die NOS 2-Aktivität in humanen Hepatozyten (HepG2- und AKN-Zellen) und Rattenhepatozyten nach Zytokinaktivierung untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. *Materialien*

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Arginin (L-)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA (bovines Serum Albumin)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Carbogen-Gas	Linde, Unterschleißheim, Deutschland
Collagenase H (0,3 U/mg)	Roche, Basel, Schweiz
ECL™- Super Signal® West Pico Chemoluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (1% wässrige Lösung, 10mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Pharmacia, Heidelberg, Deutschland
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff Test (Urea Assay)	Sigma Diagnostics, St. Louis, MD, USA
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₃ PO ₄ (Ortho-Phosphorsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄ (Kalim Dihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Bio-Rad, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol 98%	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NAME (L-) (N ^G -amino-methylester)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
NaNO ₂ (Natriumnitrit)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NIO (L-) (N ⁵ -iminoethyl-L-ornithin)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Pentobarbital (Nembutal®) Lösung 60mg/ml	Richter-Pharma, Wels, Deutschland
NEDCC (N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Neutralrot-Lösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phenolrot-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinlysepuffer	Bio-Rad, München, Deutschland
RC DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
Sulfanilamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin (Viralex)	PAA, Linz, Österreich
Tween 20	Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.2. Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur

RPMI 1640-Medium	PAA, Linz, Österreich
RPMI 1640 Medium ohne Arginin, Cystein, Leucin, Methionin, Inositol, Glucose und Glutamin	Biomol, Berlin, Deutschland
DMEM (1x) High Glucose: Dulbeccos Minimal Essential Medium	PAA, Linz, Österreich
FCS- Standard: Fetal calf serum, [LPS-Gehalt 4,5ng/ml (inaktiviert)]	PAA, Linz, Österreich
FCS- Gold High Quality: Fetal calf serum, LPS-Gehalt 2,4 ng/ml (inaktiviert)	PAA, Linz, Österreich
HEPES (Puffer 1M)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Novex Tris Acetate SDS Running Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage MOPS SDS Running Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM: nicht essentielle Aminosäuren (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat (100mM)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
NuPage 10% Bis-Tris Gel (1mm x 10 wells)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage Reduction Agent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage See Blue Stain	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (1000U/mg)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Arginin-Supplement (L-) (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Inositol-Supplement (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Glukose-Supplement (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Cystein-Supplement (L-) (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Leucin-Supplement (L-) (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Methionin (L-)-Supplement (100x)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Glutamax I (100x) (L-Alanyl-L-Glutamin)	GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Insulin (aus bovinem Pankreas) (25000U)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.3. Zytokine

Rekombinantes humanes Interleukin-1 β

(IL-1 β) 2×10^8 Units/mg	Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland
Rekombinanter humaner Tumor-Nekrose- Faktor α (TNF- α) 1×10^8 Units/mg	Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland
Rekombinantes humanes Interferon- γ (IFN- γ) 2×10^7 Units/mg	Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland
Rekombinantes murines Interferon- γ (IFN- γ) 1×10^7 Units/mg	Strathmann Biotech, Hannover, Deutschland

2.1.4. Antikörper

Anti-Arginase 1 (SA 5226) Host: Rabbit; polyklonal	Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Deutschland (Prof. Pfeilschifter)
Anti-Arginase 1 (A59120) Host: Mouse; Isotype: IgG1; Molekulargewicht 35kD; Konzentration 250 μ g/ml; monoklonal Positiv getestet auf Ratte und Maus	Transduction Laboratories, Lexington , KY, USA
Anti-iNOS (NOS 2) (AB5384) Host: Rabbit; polyklonal Positiv getestet auf Mensch	Chemicon Int. Temecula, CA, USA
Anti-iNOS (NOS 2) (N32020) Host: Mouse; Isotope: IgG2a; Molekulargewicht 130kD; Konzentration 250 μ g/ml; monoklonal Positiv getestet auf Mensch, Ratte und Maus	Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA

Horseradish-Peroxidase-Rabbit

Anti-Goat IgG

(H+L)

Zymed Laboratories,
San Francisco, CA, USA

Horseradish-Peroxidase-Goat

Anti-Rabbit IgG

(H+L)

Zymed Laboratories
San Francisco, CA, USA

Anti-alpha-Tubulin (T5168)

Positiv getestet für Ratte, Maus, Mensch)

Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.5. Primer

PRODUKT	SEQUENZ	BASEN/GRÖSSE (bp)
Rat NOS 2 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-ATGCCCGATGGCACCATCAGA-3' 5'-TCTCCAGGCCCATCCTCCTGC-3' D14051 36-38 x (30'' 94°C, 30'' 62°C, 30'' 72°C) +5' 72°C	825-846 1198-1218 394 bp
Human NOS 2 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-TGCCAGATGGCAGCATCAGA-3' 5'-TTTCCAGGCCATTCTC CTGC-3' L09210 38-40 x (30'' 90°C, 60'' 58°C, 60'' 72°C) +5' 72°C	1021-1040 1394-1413 393 bp
Human GAPDH Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-CAACTACATGGT TTACATGTTCC-3' 5'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3' M17851 17-20 x (30'' 90°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C) +5' 72°C	153-175 549-568 399 bp
Rat GAPDH Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-CAACTACATGGT TTACATGTTCC-3' 5'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3' M17851 17-20 x (30'' 90°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C) +5' 72°C	153-175 549-568 399 bp
Rat Arginase 1 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-ATGGAACAATCAGTGTGGTG -3' 5'-CTGGTGTCTTCCCAAGAGTT -3' NM_017134 39 x (30'' 94°C, 30'' 58°C, 30'' 72°C) +5' 72°C	295-315 866-886 592 bp
Human Arginase 1 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-CTTAAAGAACAAGAGTGTGAT -3' 5'-TTCTTCCTAGTAGATAGCTGAG -3' XM 011440 31 x (30'' 9°C, 30'' 5°C, 30'' 7°C) +10' 72°C	176-198 704-726 551 bp

Rat Arginase 2 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-GCTGTGTCACACTGGGAGGAGACC -3' 5'- CTGCTAGGCTGGCTGTAGCCTTGG-3' NM 019168 40 x (30'' 90°C, 60'' 56°C, 60'' 72°C) +5' 72°C	438-461 1026-1049 612 bp
Human Arginase 2 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-CTCCAGTTTGGGCTGCCACC -3' 5'-TCTTGCCAATCAGCAGATCAAA -3' XM 012363 40 x (30'' 90°C, 60'' 56°C, 60'' 72°C) +5' 72°C	213-233 742-764 552 bp
Human CAT 2 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-AGCCTGGCTTATCTTACGAC -3' 5'-AATCTGACCCAAGTGTCTGC -3' D29990 24 x (30'' 94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C) +10' 72°C	1304-1324 1741-1761 437 bp
Rat CAT 2 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-ATGGTGGCTGGGTTTGTGAAAG-3' 5'-CAACCCATCCTCCGCCATAGC-3' U53927 38 x (30'' 94°C, 60'' 58°C; 60'' 72°C) +5' 72°C	18-39 489-509 492 bp
Rat CAT 1 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-GCCATCGTCATCTCCTTCCTG-3' 5'-CCCTCCCTCACCGTATTTACAC-3' U70476 39 x (30'' 90°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C) +5' 72°C	272-292 782-802 531 bp
Human CAT 1 Sense Antisense GeneBank Accession NR. Zyklusprotokol	5'-CCAACGTC AATGATAGGACC -3' 5'-CTGGTCCAGCTGCATCATGA -3' NM_003045 32 x (30'' 94°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C) +10' 72°C	1274-1294 1877-1897 603 bp

2.1.6. Materialien für die Reverse Transkription und die PCR

DNA Electrophoresis Marker	Roche, Prenzberg, Germany
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden, Germany
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Germany
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden, Germany

2.1.7. Geräte

Brutschrank: 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit, 5% CO ₂ , 95% Luft	Heraeus, Osterode, Deutschland
Gelkammern für DNA-Gelelektrophorese	Serva, AGS, Heidelberg, Deutschland
Photometer (RNA-Bestimmung)	Beckmann, Düsseldorf, Deutschland

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	PerkinElmer, Shelton, CT, USA
Sterilbank: LaminAir	Heraeus, Osterode, Deutschland
Tischzentrifuge: 5412	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Transluminator (DNA-Gele)	Bachofen, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge (RNA-Isolation, Western Blot)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellzentrifuge: Minifuge GL	Heraeus, Osterode, Deutschland
Thermoblock TB1 (RT)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Blottingkammer Novex Thermoflow	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Geräte zur Fotoentwicklung	Kodak, Stuttgart, Deutschland

2.1.8. Einwegartikel für die Zellkultur

Plastikartikel für die Zellkultur	Falcon (BD), Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1ml, 5ml)	Welabo, Langenfeld, Deutschland

2.1.9. Tiere

Für die Isolationen der primären Hepatozyten wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von ca. 150g und einem Alter von 1-2 Monaten verwendet. Alle Tiere erhielten eine Standard-Diät und Trinkwasser nach Belieben. Sie stammten von der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf.

2.1.10. Zellen

AKN-Zellen stammen von humanem Gallengangsepithel ab und wurden von Nüssler [75] charakterisiert und isoliert.

HepG2-Zellen sind humane Hepatom-Zelllinien und wurden von Morris und Schwartz charakterisiert [76, 77].

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von HepG2- und AKN-Zelllinien

HepG2- und AKN-Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS auf 10cm Zellkultur-Petrischalen kultiviert. Das Medium wurde jeden 2. Tag gewechselt. Nach Ausbildung eines ‚Monolayers‘ wurden die adhärent wachsenden Zellen mit der im Folgenden beschriebenen Trypsinierungsmethode von der Kulturschale gelöst und für die Versuche in entsprechender Zellzahl eingesetzt.

2.2.2. Trypsinierung adhärenter Zellen

Die Mediumüberstände wurden unter sterilen Bedingungen von den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen wurden 3x mit angewärmten PBS gewaschen. Danach wurden bei AKN-Zellen 5ml PBS mit 500µl Trypsin gemischt, bei HepG2-Zellen 5ml PBS und 800µl Trypsin gemischt, um die Zellen von der Kulturschale abzulösen. Nach 2-3min Inkubation der Zellschalen im Inkubator und anschließender mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen von der Schale mit Hilfe einer serologischen Pipette abgespült. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden nach Ablösung 2ml Zellkulturmedium mit 10% FCS hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen bei 1040rpm für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Zentrifugation mit Zellkulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturschalen ausgesät bzw. für die Versuche eingesetzt.

2.2.3. Auftauen eingefrorener Zellen

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sodann in 10ml Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min bei 1040rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde nach Resuspendierung auf Kulturschalen ausgesät. Nach der Regeneration war zum Beginn der optimalen Zellvermehrung ein Zeitraum von 3-7 Tagen eingeplant worden.

2.2.4. Isolation und Kultivierung von primären Rattenhepatozyten

Benötigte Lösungen und Chemikalien:

Nembutal® (Pentobarbital) ad us. vet. 60mg/ml

Stammlösung I (20x) 69g NaCl auf 500ml Aqua bidest

Stammlösung II (20x) 4,45g KCl + 4,45g Na₂HPO₄·2H₂O + 3,1g NaH₂PO₄·2H₂O
auf 500ml Aqua bidest

Stammlösung III (20x) 16,8g NaHCO₃ auf 500ml Aqua bidest

Perfusionspuffer : 25ml Stammlösung I+ 25ml Stammlösung II+ 25ml

Stammlösung III+1ml Phenolrotlösung +5g Glucose auf 500ml

Aqua bidest bei pH 7-7,4

Durchführung:

Männliche Wistar-Ratten wurden mit 150µl Nembutallösung intraperitoneal narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens wurden die Ligamenta der Leber durchtrennt und der Ösophagus ligiert. Die perihepatischen Zugangs- und Abflußwege wurden freigelegt und die Vena cava inferior wurde unterhalb der Vena renalis ligiert. Anschließend wurde die Vena portae aufgesucht und eine Perfusionskanüle eingeführt. Nach Fixierung der Kanüle wurde sofort mit der Perfusion begonnen. Nach Thorakotomie wurde die 2. Kanüle in das rechte Herzatrium bzw. in die Vena cava inferior platziert. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 30-32 ml/Minute. Für die Entblutung der Leber waren 80ml Perfusionspuffer einzusetzen. Zur Auflösung des Gewebeverbandes sollte die gelöste Collagenase 10-20min rezyklieren.

Anschließend erfolgte die vorsichtige Säuberung der Leber und die einzelnen Hepatozyten wurden unter Kühlung aus dem Gewebeverband gelöst. Nach Abtrennung von intrahepatischem Bindegewebe wurde die Zellsuspension filtriert und mehrmals steril mit DMEM-Zellkulturmedium gewaschen. Letztlich erfolgte eine vorsichtige Zentrifugation bei 200rpm für 3-5min mit anschließender Carbogen-Begasung. Nach Isolation wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung das Verhältnis der lebenden zu den toten Zellen bestimmt.

2.2.5. Kultivierung der Rattenhepatozyten

Nach der Isolation wurden die Zellen unter ständiger Durchmischung auf die Kulturschalen verteilt. Aufgrund der Zellgröße kam es im Zentrifugationsgefäß bereits nach kurzer Dauer zu einer ausgeprägten Sedimentation, wodurch die berechnete Zellzahl zum Teil auf den einzelnen Wells abweichen konnte. Nach Aussaat der Hepatozyten wurden die Zellen inkubiert. Durch den Isolationsvorgang konnte nach 24 Stunden Nitrit im Überstand gemessen werden. Diese Voraktivierung wurde bereits beschrieben [78]. Daher wurden die Zellen vor dem Einsatz in Versuchen für 24 Stunden zur Regeneration im Inkubator belassen. Danach erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in entsprechendem Verhältnis für die Versuche eingesetzt.

2.2.6. Aktivierung von Zellen und Inkubation mit L-Arginin-freiem Medium

Um Rattenhepatozyten bzw. humane Leberzelllinien zu aktivieren wurden für 5×10^5 Zellen jeweils 1000U TNF- α , IL-1 β und IFN- γ in RPMI 1640 bzw. DMEM (Rattenhepatozyten) gelöst und den Zellkulturen hinzugefügt. Aufgrund der hohen Zytokinkonzentrationen im Medium wurden Zellzählungen mittels Höchst-Färbung und Neubauer-Zählkammer durchgeführt, um die Zahl der toten Zellen zu bestimmen.

Für die Versuche mit variablen L-Arginin-Konzentrationen im Medium wurde L-Arginin-freies Medium (Biomol) mit RPMI 1640 (PAA) vermischt entsprechend der gewünschten Konzentration an L-Arginin im Medium. Beide Medien waren in ihren Bestandteilen bis auf L-Arginin identisch. Es kamen L-Arginin Medium-Konzentrationen von 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000 μ M zum Einsatz.

Aufgrund der besonderen Kulturbedingungen für Rattenhepatozyten musste für diese Versuche L-Arginin-freies RPMI 1640 den Zusätzen von DMEM angepasst werden. Dabei wurden jenem RPMI 1640 25000 U/l Insulin sowie 2500mg Glucose pro Liter hinzugefügt. Die gewünschten L-Arginin-Konzentrationen wurden durch ein Gemisch aus DMEM und adjustiertem L-Arginin-freiem RPMI 1640 zusammengestellt.

Bevor die humanen Leberzelllinien für die Versuche mit variablen L-Arginin-Konzentrationen eingesetzt wurden, inkubierten sie für 24h in L-Arginin-freiem RPMI 1640. Rattenhepatozyten wurden nach der Isolation für 24h in DMEM (1mM L-Arginin) inkubiert, dann wurde das Medium zu L-Arginin-freiem, angepassten RPMI 1640 (Biomol) gewechselt. Erst danach wurden die L-Arginin-Konzentrationen im Medium variiert und die Zellen inkubiert.

2.2.7. Zugabe von Aminosäuren zum Medium

Für Versuche mit den Aminosäuren L-Valin, L-Lysin und L-Ornithin wurden Lösungen mit einer Aminosäure-Konzentration von 20mM erstellt. Die Aminosäuren wurden in DMEM, RPMI 1640, L-Arginin-freiem RPMI 1640 oder adjustiertem L-Arginin-freiem RPMI 1640 gelöst. Dabei wurde der Einfluss der hinzu gegebenen Aminosäuren auf die L-Arginin-Konzentration im Medium berücksichtigt.

2.2.8. Isolation der RNA

Um RNA aus kultivierten Zellen zu isolieren, wurde das Medium abgesaugt und pro Well wurde 350µl RLT-Lysepuffer hinzugefügt. Für die weitere Aufbereitung wurde das RNeasy Kit verwendet. Die lysierte Zell-Suspension wurde in QIAshredder überführt und 2 min in der Zentrifuge bei 8000g homogenisiert. Das homogenisierte Lysat wurde mit 350µl 70% Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde dann auf RNeasy Spin Säulen pipettiert und 15 sec bei 8000g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und auf die Säulen wurden 700µl des RW-1-Puffers aufgetragen. Nach erneuter 15 sec Zentrifugation und Verwerfen des Eluates wurden nochmals 350µl desselben Puffers aufgetragen. Daraufhin wurden 2 weitere Waschschrte und Zentrifugationen mit je 500µl RPE Puffer vorgenommen. Nach dem 2. Waschvorgang wurde 2 min zentrifugiert. Die Säulen wurden sodann 3 min bei Raumtemperatur in eine Vakuumzentrifuge gegeben. Auf die trockenen Säulen wurde dann 50µl RNase-freies Wasser pipettiert, kurz zentrifugiert und schließlich auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und des Verunreinigungsgrades der einzelnen Proben wurden Verdünnungen von 1:50 hergestellt, deren Extinktion bei

260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) im Spektrophotometer bestimmt wurden. Aus der Extinktion bei 260 nm wurde die Konzentration und aus dem Verhältnis von Extinktion bei 260nm / Extinktion bei 280 nm der Reinheitsgrad der RNA bestimmt. Die RNA wurde sodann zunächst auf Eis portioniert und bei -80°Celsius eingefroren.

2.2.9. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription (RT) wurde das Omniscript RT Kit verwendet. Alle Schritte dieses Verfahrens fanden auf Eis statt. Für den Ansatz von 2µg einer RNA-Probe bei einer portionierten RNA Konzentration von 0,1 µg/µl wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

10x RT Puffer	4µl pro Probe
d-NTP (0,5 mM)	4µl pro Probe
Oligo dt (20 pM)	2µl pro Probe
RNAse Inhibitor 40 U/µl	0.5µl pro Probe
Omniscript Rtase	0,5µl pro Probe
Rnase freies Wasser	9µl pro Probe
RNA-Probe (0,1µg/µl)	20µl

Es folgte eine Durchmischung der Proben auf dem Vortex und anschließend eine Inkubation bei 37°C für 60 Minuten. Die erhaltenen c-DNA Proben wurden entweder sofort für die RT-PCR verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.10. RT-PCR

Für die Amplifikation von humaner bzw. Ratten c-DNA wurden die unter 2.1.5. angegebenen Primersequenzen gewählt. Alle Sequenzen wurden aus dem Datenverzeichnis der Genbank (National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA) entnommen. Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurde das TaqPCR-Kit verwendet. Pro Probe wurde 5µl c-DNA mit folgenden Reagenzien vermischt, so dass insgesamt ein Probenansatz von 50µl entstand:

DNase freies Wasser	36,75µl pro Probe
10x PCR Puffer	5µl pro Probe
d-NTP-Mix	1µl pro Probe
Taq-Polymerase	0,25µl pro Probe
Primer (Sense)	1µl pro Probe
Primer (Antisense)	1µl pro Probe
c-DNA-Probe	5µl pro Probe

Zu den c-DNA Proben wurden eine „Negativ-Kontrolle“ -bestehend aus einem vollständigen Reagenzien-Mix, der anstelle der c-DNA Probe die entsprechende Menge an Wasser enthielt- und eine „Positiv-Kontrolle“ -bestehend aus einem vollständigen Reagenzien-Mix, der anstelle der c-DNA Probe die entsprechende Menge c-DNA einer gesicherten Expression des Amplifikationsproduktes aufwies- hinzugefügt. Die RT-PCR Bedingungen waren von den Amplifikationsprodukten abhängig und sind daher bei den einzelnen Primern unter 2.1.5. mit aufgeführt. Um eine optimale Bandenstärke zu erzielen, wurden die PCR-Bedingungen für das Amplifikationsprodukt austriert oder bei bereits etablierten Profilen übernommen. Darüber hinaus wurde von jeder RT-Reaktion ein „Aliquod“ der c-DNA in eine GAPDH-spezifische PCR-Reaktion eingesetzt (Glycerinaldehydphosphatdehydro-

genase), um zu gewährleisten, dass die RT-Reaktionen erfolgreich durchgeführt wurden und um zu zeigen, dass die zu untersuchenden Proben die gleiche Menge an c-DNA enthielten.

2.2.11. Nachweis der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese

1% Ethidiumbromidlösung: 1:10 Verdünnung in Aqua bidest

50x TAE-Puffer:
Tris/acetat 2M
EDTA 0,1M

Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:50 mit Aqua bidest verdünnt.

Probenpuffer (5x):
Bromphenolblau 0,25%
Ficoll 400 15%
Glycerin 15%

Der Probenpuffer wurde in Aqua bidest gelöst.

Bandenmarker:
Roche DNA-Bandenmarker 2µl
Probenpuffer 5µl
Aqua ad injectabilia 13µl

Es wurden 1,8g Agarose in 100ml TAE-Puffer (1x) kurz aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und 5µl einer 1:10 verdünnten Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Nach Polymerisation des Gels wurden pro Geltasche ein Gemisch aus 15µl der jeweiligen Probe und 5µl Probenpuffer eingesetzt. Die letzte Geltasche wurde versehen mit dem Bandenmarkergemisch. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 30 min in einer Gelkammer bei einer Spannung von 110V. Die Identifikation der PCR-Amplifikate erfolgte unter dem UV-Transluminator durch Vergleich der sichtbaren Banden mit dem mitgeführten DNA-Bandenmarker (Längenstandard).

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Gel mit dem Digitalkamera-System DC 20 (Kodak) photographiert und die Bilder zur weiteren Datenverarbeitung gespeichert. Die Bandenstärke (Integral aus der Fläche und der Intensität der Bande) des Amplifikationsproduktes wurde mit Hilfe des Softwareprogramms Kodak 1D

bestimmt. Die Bandenstärke des Amplifikationsproduktes wurde dann jeweils zu dem mitgelaufenen Referenzwert (GAPDH) in Relation gesetzt.

2.2.12. Nitritbestimmung nach Griess

Lösungen

Griess-Lösung I: 1% Sulfanilamid in 2,5% H_3PO_4

Griess-Lösung II: 1% N-Naphtylethylendiamindihydrochlorid in 2,5% H_3PO_4

Nitritstandardreihe: 7 Natriumnitritlösungen in aufsteigender Konzentration von 0; 2; 5; 5; 10; 20; 50 und 100 μM NaNO_2 in Zellkulturmedium.

Versuchsansatz

100 μl des zu untersuchenden Kulturüberstandes wurden in ein Well einer 96-Well ELISA-Platte pipettiert und 50 μl Griess-Lösung I anschließend 50 μl Griess-Lösung II hinzu gegeben. Durch leichtes Bewegen der ELISA-Platte wurde eine Durchmischung der Lösungen gefördert. Um vorhandene Luftblasen zu entfernen, wurden 20 μl Methanol pro Well hinzu pipettiert. Der durch die beiden Griess-Lösungen aufgetretene rote Farbumschlag konnte durch Extinktionsmessung im ELISA Photometer bei 540nm quantifiziert werden. Zu jeder Messung wurden ein Nitritstandard und mehrere Mediumkontrollen mitgeführt. Die Extinktionswerte der Mediumkontrollen wurden von den Messwerten der Proben abgezogen.

2.2.13. Harnstoff-Bestimmung

Für die Harnstoffbestimmung im Mediumüberstand wurde der Urea Nitrogen Assay von Sigma Diagnostics verwandt. Pro Probe wurden 10 μl des Mediumüberstandes mit 500 μl Urease-Lösung versetzt and anschließend für 10min bei 37°C inkubiert. Den Proben wurde jeweils 1ml phenolische Natriumprussidlösung, 1ml alkalische

Hypochlorit-Lösung und 5ml Wasser hinzu pipettiert. Nach 30min wurde die Farbreaktion der Proben bei 570nm im Absorptionsspektrophotometer gemessen und die Konzentration bestimmt. Als Eichreihe wurde eine Harnstoff-Standard-Lösung mit Konzentrationen von 0, 15, 30, 45, 60, 75 mg/dL Harnstoff eingesetzt.

2.2.14. Western Blot Verfahren

<u>Waschpuffer pH 7,5 (1000ml):</u>	Magermilchpulver	4g
	Tween	500µl
	10x PBS	100ml
	Aqua bidest ad	1000ml
<u>Blockingpuffer pH 7,6:</u>	Waschpuffer	100ml
	Magermilchpulver	3g
<u>Äußerer Runningpuffer pH 7,6:</u>	20x MOPS	50ml
	Aqua bidest ad	1000ml
<u>Innerer Runningpuffer pH 7,6:</u>	Äußerer Runningpuffer	100ml
	Antioxidans (Ascorbinsäure)	250µl
<u>Blottingpuffer pH7,5:</u>	20x Transferpuffer	50ml
	Antioxidans	1ml
	Methanol	200ml
	Aqua bidest	ad 1000ml

Dieser Puffer wurde vor Gebrauch entgast.

<u>Proteinlysepuffer 100µl:</u>	2-Mercaptoethanol	5µl
	Lysepuffer mit SDS (Roche)	95µl
	Proteinaseinhibitor (Roche)	½ Tablette

Alle Puffer wurden bei 4°C gekühlt und stets frisch zubereitet.

Antikörperlösungen:

Antikörperlösungen wurden kurz vor deren Einsatz in Blockingpuffer gelöst und abhängig von der Beschaffenheit des AK verdünnt. Primäre AK wurden in Konzentrationen von 1:1000 – 1:2500 eingesetzt während sekundäre AK in Konzentrationen von 1:20000 – 1:50000 angewandt wurden.

Proteinaufbereitung

Zellkulturen wurden mit 2x 50µl Proteinlysepuffer behandelt und die viskösen Lysate wurden in QIAshredder übertragen und kurz zentrifugiert. Danach wurden die Proben entweder bei -80° C eingefroren oder direkt für die weiteren Verfahren verarbeitet.

Für jede 10µl Probe wurde 1µl NuPage Reducing Agent hinzugefügt und es folgte eine 5-10 minütige Inkubation bei 75° C.

Um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen benutzten wir den BioRad DC Proteinassay. Als Proteinstandard wurden Konzentrationsreihen mit bovinem Serum Albumin (BSA) benutzt. Die Farbreaktion der Protein-Proben wurde im Absorptionsspektrometer bei 570nm gemessen.

Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 10% Bis-Tris Gele verwendet. Die Blottingapparatur wurde mit äußerem Runningpuffer bei 4° C gekühlt. Das Innere wurde mit innerem Runningpuffer aufgefüllt. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 30 (-60)µg eingesetzt und mittels einer Ultrapipette in die Schlitze der Gelkammer pipettiert. Pro Gel wurden neben den Proteinproben immer eine Positivkontrolle und ein Proteinmarker mitgeführt.

Das Gel wurde initial (-5min) bei einer Spannung von 30V anschließend für 60 min bei 200V aufgetrennt.

Blotting

Die Blottingapparatur wurde von unten nach oben wie folgt aufgebaut: 3 Schwämme, 1 Filterpapier, 1 Cellulosemembran, 1 aufgetrenntes Gel, 1 Filterpapier und 3 Schwämme. Die Blottingapparatur wurde bei 4° C in die Blottingkammer eingespannt und mit Blottingpuffer aufgefüllt. Nach initialer Spannung von 5V wurde für 60min bei 30V geblottet. Danach wurden mit 5ml Phenolrot-Lösung die Proteinbanden auf der

Blottingmembran angefärbt um das erfolgreiche Blotting zu dokumentieren. Mittels Aqua bidest wurde die Blottingmembran entfärbt und in 25ml Blockingpuffer für 90 min bei 4°C inkubiert.

Nach der Blockingphase wurde die Membran für 60min bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend 5-8x mit Waschpuffer gewaschen.

Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 60min bei 4°C inkubiert und anschließend 10x mittels Waschpuffer gewaschen.

Chemilumineszenz und Fotoentwicklung

Für die Detektion der zu identifizierenden Proteinbande wurde das ECL Chemilumineszenz-System (Pierce) angewandt. Die Cellulosemembran wurde für 3-5min in die Chemilumineszenzlösung inkubiert und sofort in einer Dunkelkammer auf Fotoplatten (Kodak) entwickelt. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Intensität der Chemilumineszenz. Nach der Entwicklung wurden die Ergebnisse digitalisiert und densitometrisch (Kodak 1D) ausgewertet.

2.2.15. Statistische Auswertung

Alle Versuchsergebnisse wurden mindestens zweimal repliziert, so dass Angaben in den Grafiken und Tabellen immer den Mittelwert mit Standardabweichung aus mindestens 3 Versuchen darstellen. Zur Absicherung der Unsicherheit sind in den Graphiken die Standardabweichungen mit angegeben. Statistische Signifikanz wurde berechnet mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests für kontinuierliche Variablen. Für kategoriale Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

3. Resultate

3.1. *Charakterisierung der humanen Leberzelllinien*

3.1.1. HepG2-Zellen

HepG2-Zellen entstammen einer Hepatom-Zelllinie und wurden bereits durch Morris und Schwartz charakterisiert [76, 77]. Zunächst wurde der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf NOS 2 und Arginase 1 untersucht.

Die mRNA der NOS 2 bzw. der Arginase 1 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen. HepG2 wurden für jeweils 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 und 72 h mit einem Zytokin-Mix bestehend aus 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml IFN- γ inkubiert. Zur Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen für 72h kultiviert. Anschließend wurde die zelluläre mRNA isoliert und für das durchgängig exprimierte Enzym GAPDH und die NOS 2 bzw. die Arginase 1 eine spezifische RT-PCR durchgeführt. Danach wurde aus den densitometrischen Daten der Quotient NOS 2/GAPDH bzw. Arginase 1/GAPDH gebildet. Für die NOS 2 wurde der Quotient für den 24h-Wert auf 100% normiert, da man zu diesem Zeitpunkt eine volle Expression der NOS 2-mRNA annahm. Für die Arginase 1 wurde der Quotient der nicht-aktivierten Zellen auf 100% normiert. Davon ausgehend wurde die prozentuale Expression der mRNA zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

Residente HepG2-Zellen zeigten in den Versuchen bereits eine geringe Expression der NOS 2 von 18 \pm 14%. Bereits 4h nach Aktivierung erreichte die NOS 2 m-RNA ihre stärkste Expression mit 146 \pm 16%, die im weiteren Verlauf bis 48h nach Aktivierung auf 75 \pm 6% abnahm und zum Ende der Kulturzeit (72h) wieder auf 90 \pm 7% anstieg (Abb. 3 A).

Arginase 1 m-RNA ist in residenten Zellen konstitutiv exprimiert (100%). Nach Zytokinaktivierung nimmt die Expression in den ersten vier Stunden auf 176 \pm 16% zu, gefolgt von einer stetigen Abnahme der Expression, beginnend 8h nach Aktivierung (159 \pm 12%). Nach 36h (89 \pm 4%) und 48h (78 \pm 6%) liegt die Expression der m-RNA unter dem Niveau der residenten Zellen. Nach 72h kommt es zu einem erneuten Anstieg der Expression auf 86 \pm 12% (Abb. 3 B).

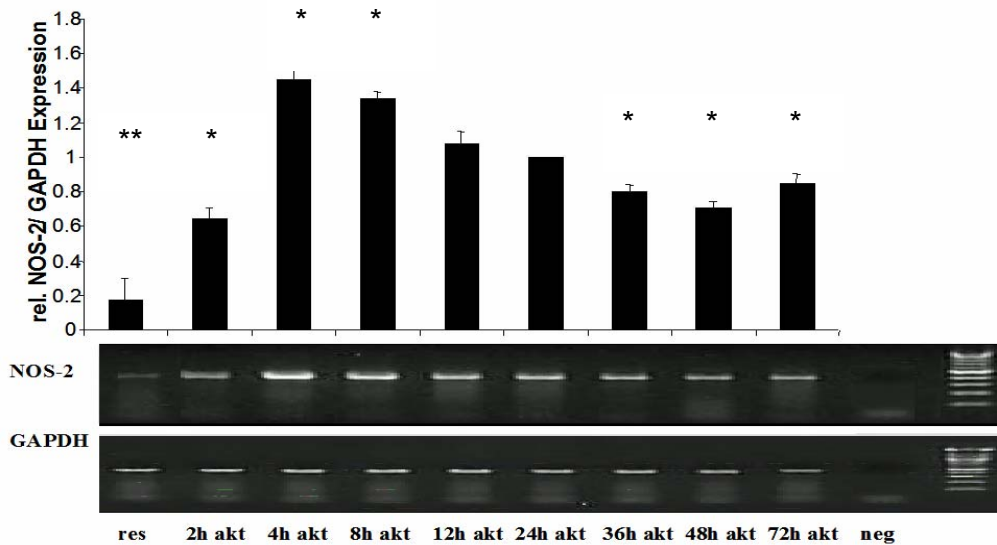
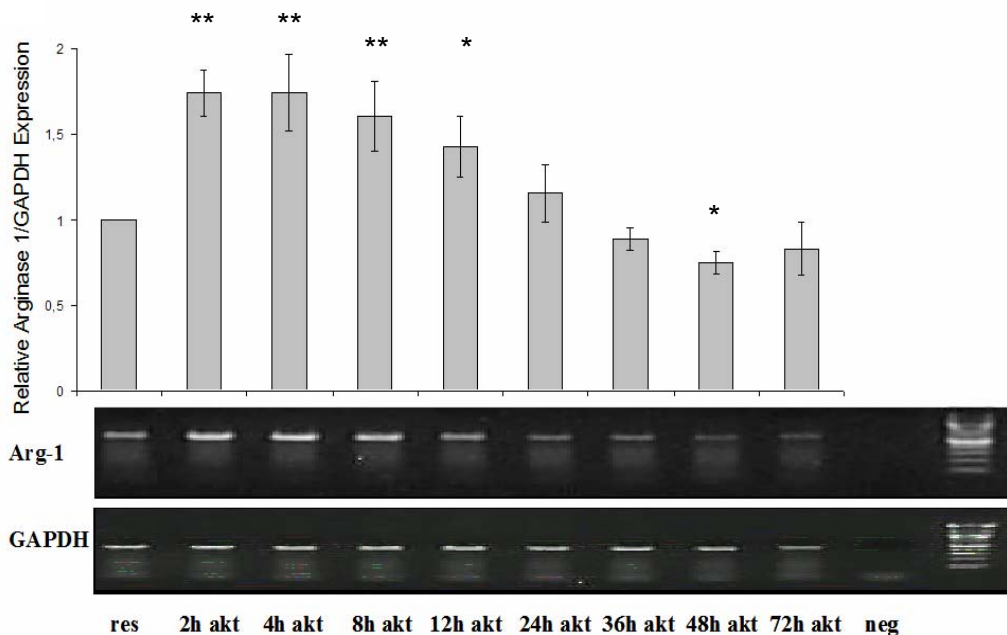
A**B**

Abbildung 3: Zeitkinetik von NOS 2-mRNA (A) und Arginase 1-mRNA (B) in HepG2- Zellen
 Die relative Expression der NOS 2- und GAPDH-mRNA (A) sowie der Arginase 1- und GAPDH-mRNA (B) in HepG2 wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 2-72h lang aktiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine NOS 2 und GAPDH (A) bzw. Arginase 1 und GAPDH (B) spezifische RT-PCR durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm zeigt die relative NOS 2- bzw. Arginase 1- mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH-mRNA Expression. Für NOS 2 wurde der für 24h berechnete Quotient auf 100% normiert, für Arginase 1 wurde der residente Quotient auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$)

bezogen auf den 24h-Wert bei NOS 2 bzw. den Wert der residenten Zellen bei Arginase 1). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen NOS 2 und GAPDH bzw. Arginase 1 und GAPDH spezifischen RT-PCR-Probe dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits in residenten Zellen eine leichte Aktivierung der NOS 2 vorliegt, die nach 4h ihr Expressionsmaximum erreicht, bis zum Zeitpunkt 48h nach Aktivierung wieder abfällt und zum Zeitpunkt 72h wieder etwas ansteigt. Arginase 1 ist in nicht-aktivierten Zellen exprimiert. Nach Aktivierung kommt es bis 24h zu einer Expressionszunahme, die dann unter das Niveau der nicht-aktivierten Zellen abfällt und zum Zeitpunkt 72h wieder leicht anzusteigen.

Nach der Untersuchung der mRNA sollte anschließend die Aktivität der gebildeten Proteine indirekt über die NO- bzw. Harnstoffproduktion nachgewiesen werden. Dabei wurde die Nitritmenge in den Kulturüberständen spektrophotometrisch mit Hilfe der Griess-Reaktion nachgewiesen. Die Zeitkinetik der NO-Produktion zeigte im Wesentlichen keine Unterschiede zwischen residenten und aktivierten Zellen. Die 24h-Werte für aktivierte Zellen ergaben eine Nitrit-Produktion von $1,56 \pm 0,08 \mu\text{M}$. Entsprechende Werte für nicht-aktivierte Zellen nach 24h Kultur lagen bei $1,64 \pm 0,19 \mu\text{M}$. Die Menge an produziertem NO nimmt sowohl in residenten als auch aktivierten Zellen in gleicher Weise über die Zeit zu. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung der Kinetik verzichtet. Die nachgewiesenen Nitritmengen liegen im unteren Empfindlichkeitsbereich der Griess-Reaktion.

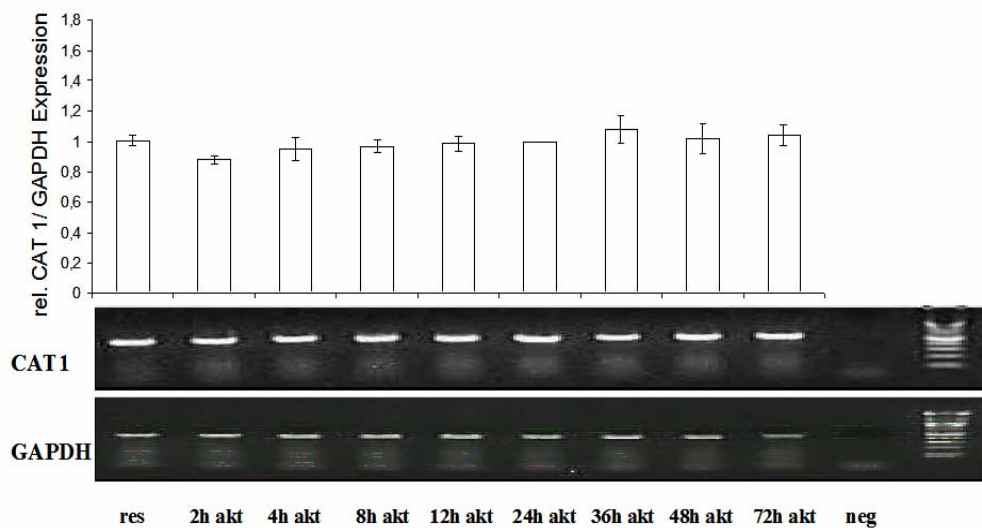
Die produzierte Menge an Harnstoff als ein Parameter für die Aktivität beider Arginasen wurde spektrophotometrisch mittels Berthelot-Reaktion gemessen. Sie zeigt ebenso wie die Produktion von Stickstoffmonoxid keine Unterschiede zwischen Zytokin-aktivierten und residenten Zellen. Über die Zeit nimmt auch hier die Menge an Harnstoff in aktivierten wie in nicht-aktivierten Zellen zu. Nach 24h wurde bei aktivierten Zellen eine Harnstoffmenge von $1,22 \pm 0,07 \text{mg/l}$ und $1,46 \pm 0,22 \text{mg/l}$ in nicht-aktivierten Zellen gemessen (Kinetik nicht gezeigt).

Ebenso wie die mRNA-Expression von NOS 2 und Arginase 1 wurden auch die mRNA-Expression der kationischen Aminosäuretransporter 1 und 2 (CAT 1 und CAT 2) und der Arginase 2 in HepG2-Zellen dargestellt. Für die semiquantitative RT-PCR für CAT 1 und 2 sowie für Arginase 2 galten dieselben Kulturbedingungen wie bereits oben beschrieben. Zellen wurden mit dem oben beschriebenen Zytokin-Mix inkubiert. Zur Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen für 72h kultiviert. Aus den densitometrischen Daten wurden der CAT 1/GAPDH, der CAT 2/GAPDH und der

Arginase 2/GAPDH Quotient gebildet. Für CAT 1 und 2 und Arginase 2 wurde der Quotient für den 24h-Wert auf 100% normiert.

Der relative Expressionsquotient der Aminosäuretransporter wurde durch den zugefügten Zytokinmix nicht beeinflusst. Sowohl CAT 1 als auch CAT 2 sind in nicht-aktivierten und aktivierten Zellen vorhanden, ohne dass sich die Expression über die Zeit verändert (Abb. 4 A und B). In gleichem Maße wie die CATs bleibt auch die Expression der mitochondrialen Arginase 2 durch die Aktivierung über den Zeitraum von 72h unbeeinflusst (Abb. 5).

A



B

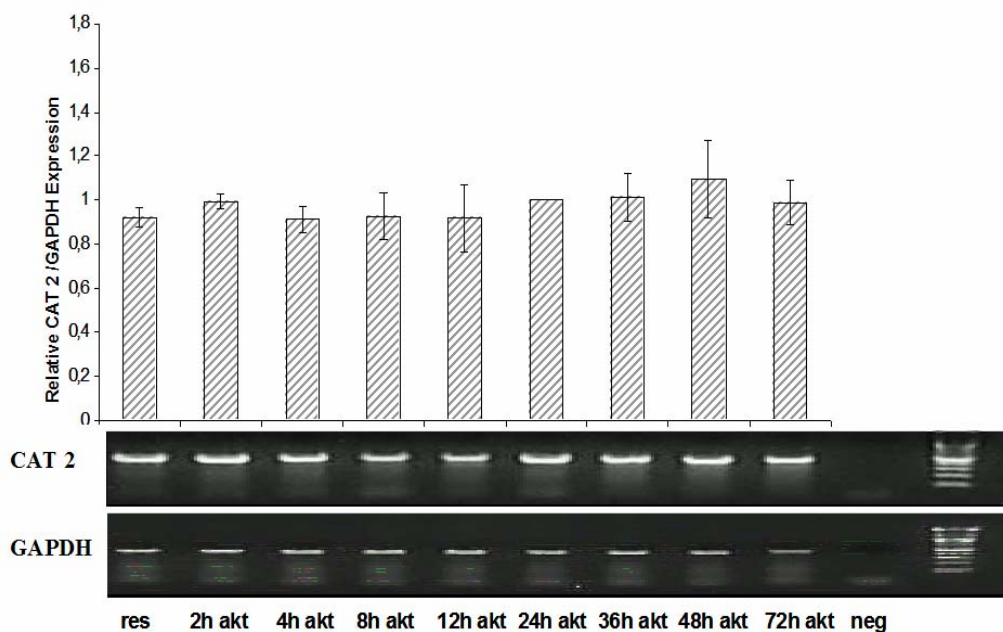


Abbildung 4: Zeitkinetik von CAT 1-mRNA (A) und CAT 2-mRNA (B) in HepG2-Zellen

Die relative Expression der CAT 1- und der GAPDH-mRNA (A) sowie der CAT 2- und GAPDH-mRNA (B) in HepG2 wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 2-72h lang aktiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine CAT 1 und GAPDH (A) bzw. CAT 2 und GAPDH (B) spezifische RT-PCR durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm zeigt die relative CAT 1- bzw. CAT 2- mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH-mRNA Expression. Für beide Produkte wurde der für 24h berechnete Quotient auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen CAT 1 und GAPDH bzw. CAT 2 und GAPDH spezifischen RT-PCR-Probe dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die bereits in residenten Zellen vorhandene Expression von CAT 1 und 2 auch nach Aktivierung über einen Zeitraum von 72h unverändert bleibt.

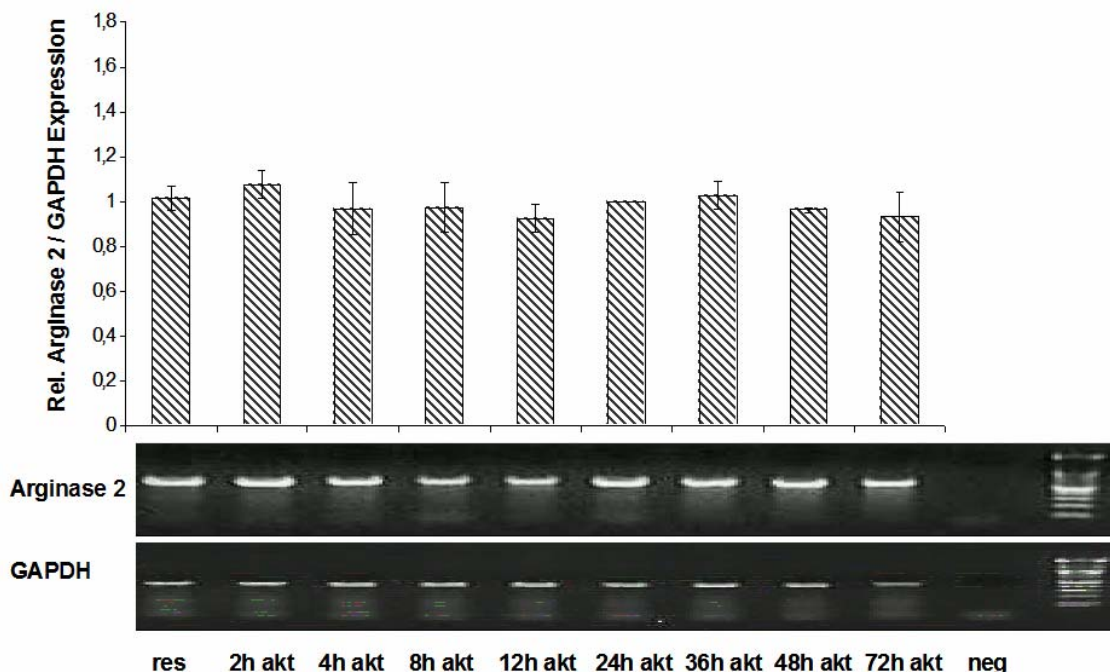


Abbildung 5: Zeitkinetik von Arginase 2 m-RNA in HepG2-Zellen

Die relative Expression der Arginase 2- und der GAPDH-mRNA in HepG2 wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 2-72h lang aktiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine Arginase 2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm bildet die relative Arginase 2- mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH-mRNA Expression ab. Es wurde der für 24h berechnete Quotient auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen Arginase 2 und GAPDH spezifischen RT-PCR-Probe dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die bereits in residenten Zellen vorhandene Expression von Arginase 2 auch nach Aktivierung über einen Zeitraum von 72h nicht signifikant verändert.

Aufgrund der in aktivierten und residenten Zellen ähnlichen Nitrit- und Harnstoffmengen sollte im Folgenden die Aktivität von NOS 2 und Arginase 1 mit Hilfe eines Western Blots untersucht werden. HepG2 wurden für jeweils 24, 48 und 72 h mit einem Zytokin-Mix bestehend aus 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml IFN- γ inkubiert. Zur Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen für 72h kultiviert. Anschließend wurden die zellulären Proteine isoliert und für das durchgängig exprimierte Protein α -Tubulin und das NOS 2 bzw. das Arginase 1 Protein ein spezifischer Western Blot durchgeführt. Danach wurde aus den densitometrischen Daten der Quotient NOS 2/ α -Tubulin bzw. Arginase 1/ α -Tubulin gebildet. Davon ausgehend wurde die prozentuale Proteinexpression zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

Die Expression von NOS 2-Protein ähnelt den Ergebnissen der NOS 2-mRNA. In nicht-aktivierten Zellen lag die Proteinexpression bei 3 \pm 3%. Nach Aktivierung der Zellen findet man eine im Zeitverlauf deutliche Zunahme des NOS 2 Proteins mit einer relativen Expression von 11 \pm 10% nach 24h, 23 \pm 6% nach 48h und 95 \pm 6% nach 72 Stunden (Abb. 6 A). Neben der Darstellung einer NOS 2-charakteristischen Bande kam es auch zur Darstellung einer Vielzahl uncharakteristischer Banden. Dies lässt vermuten, dass die Spezifität des anti-humanen NOS 2-Antikörpers eingeschränkt ist. Eine Interpretation der Protein-Aktivität anhand der Western-Blot-Ergebnisse ist daher nicht aussagekräftig.

Die Protein-Expression der Arginase 1 lag in residenten Zellen bei 80 \pm 5%. Anders als bei den Ergebnissen der m-RNA-Expression findet sich hier keine initiale Zunahme nach Aktivierung, sondern die Expression bleibt zunächst konstant (24h 77 \pm 4%, 48h 79 \pm 7%). Erst nach Kultivierung von 72h ist eine verminderte Expression von 54 \pm 3% erkennbar (Abb. 6 B).

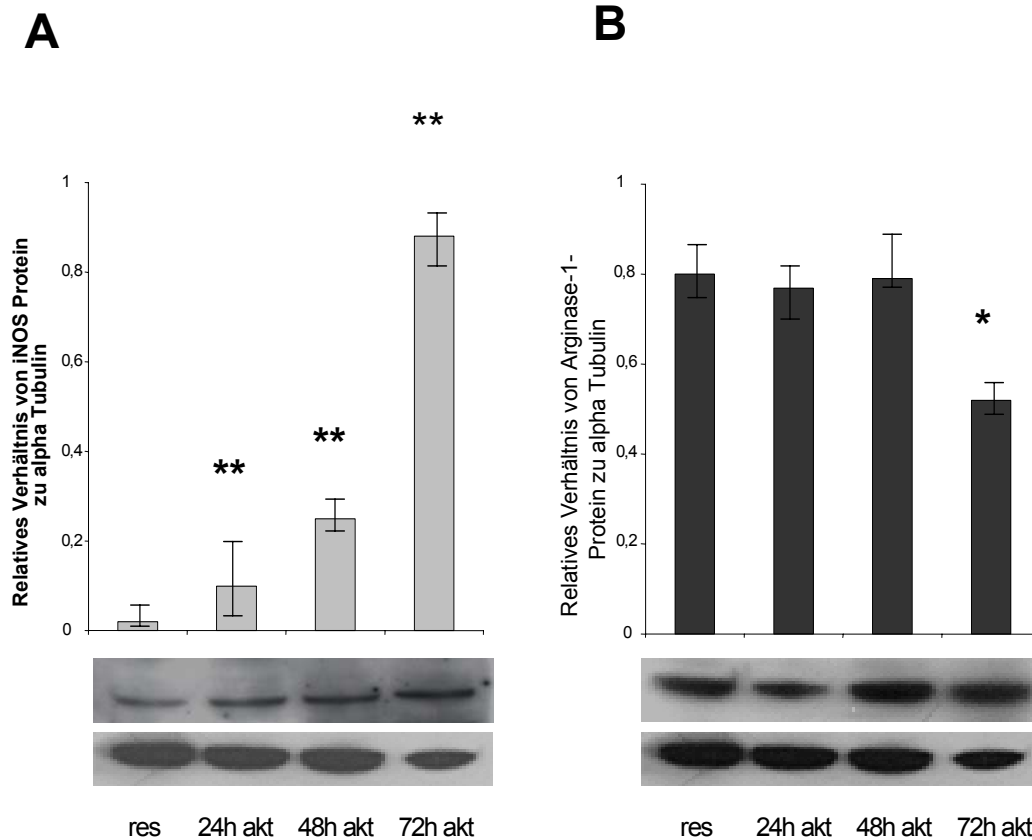


Abbildung 6: Zeitkinetik der NOS 2- (A) und Arginase 1 Proteinexpression (B) in HepG2.

Die relative Proteinexpression der NOS 2 und der Arginase 1 in HepG2 wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. HepG2-Zellen wurden 24,48 oder 72h lang aktiviert. Anschließend wurde das zelluläre Protein isoliert und ein NOS 2- bzw. Arginase 1-spezifischer Western Blot durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm bildet die relative NOS 2- bzw. Arginase 1 Proteinexpression im Vergleich zum durchgängig exprimierten α -Tubulin Protein ab. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ jeweils bezogen auf residente Zellen). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen NOS 2 und α -Tubulin bzw. Arginase 1 und α -Tubulin spezifischen Western Blot Probe dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Aktivierung das NOS 2 Protein über den Zeitraum von 72h gebildet wird mit der höchsten Expression nach 72h. Im Gegensatz dazu bleibt die Proteinexpression der Arginase 1 bis 48h nach Aktivierung konstant und nimmt erst nach 72 h signifikant ab.

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass HepG2-Zellen nach Zytokinaktivierung NOS 2-mRNA und -Protein exprimieren. Allerdings konnte nur eine geringe Menge an produziertem NO nachgewiesen werden. Mit Hilfe von NOS-Inhibitoren (L-NAME, L-NIO) soll im Folgenden untersucht werden, ob die NO-Produktion beeinflussbar ist. Darüber hinaus soll mit dem NOS 2-Inhibitor L-NIO die Spezifität der NOS 2-Aktivität untersucht werden.

Dazu wurden HepG2-Zellen für jeweils 24, 48 und 72 h mit dem bereits beschriebenen Zytokin-Mix inkubiert. Zusätzlich wurden in einer Versuchsreihe 5mM L-NAME und in einer weiteren Versuchsreihe 5mM L-NIO hinzugefügt. Zur Kontrolle wurden nicht-aktivierte, inhibierte Zellen für 24, 48 und 72h kultiviert. Die im Kulturüberstand gebildete Nitritmenge wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion spektrophotometrisch nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl unter Zugabe von L-NIO als auch von L-NAME kein signifikanter Unterschied in der Nitritmenge zwischen aktivierten und nicht-aktivierten Zellen besteht. Die gemessenen Nitritmengen liegen im unteren Empfindlichkeitsbereich der Griess-Reaktion und haben möglicherweise Auswirkungen auf die Genauigkeit der Messwerte (Abb. 7).

Neben der Inhibition der NOS 2 kann die Arginase durch die Aminosäure L-Valin inhibiert werden. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob eine Inhibition der Arginase Auswirkungen auf die Nitrit- und Harnstoffproduktion hat.

HepG2-Zellen wurden für jeweils 48 und 72 h mit dem bereits beschriebenen Zytokin-Mix inkubiert und zusätzlich mit L-Valin (20mM) kultiviert. Zur Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen unter Zugabe von L-Valin für 48 und 72h kultiviert. Die im Kulturüberstand gebildete Harnstoffmenge wurde mit Hilfe der Berthelot-Reaktion spektrophotometrisch nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Inhibition der Arginase durch L-Valin keine Auswirkungen auf die Nitritproduktion in HepG2 hatte. Nach 24h wurde in aktivierten Zellen ohne L-Valin $0,97 \pm 0,11 \text{ mg/l}$ (48h $1,59 \pm 0,17 \text{ mg/l}$) Harnstoff gebildet und in residenten Zellen ohne L-Valin $0,98 \pm 0,09 \text{ mg/l}$ (48h $1,29 \pm 0,14 \text{ mg/l}$). Bei Zugabe von L-Valin war in aktivierten und residenten Zellen nach 24h keine Harnstoffproduktion zu messen (48h aktiviert $0,07 \pm 0,01 \text{ mg/l}$; 48h resident $0,06 \pm 0,01 \text{ mg/l}$). L-Valin führte in aktivierten und residenten HepG2 zu einer vollständigen Inhibition der Arginase ohne Auswirkungen auf die Nitrit-Produktion (Graphik nicht dargestellt).

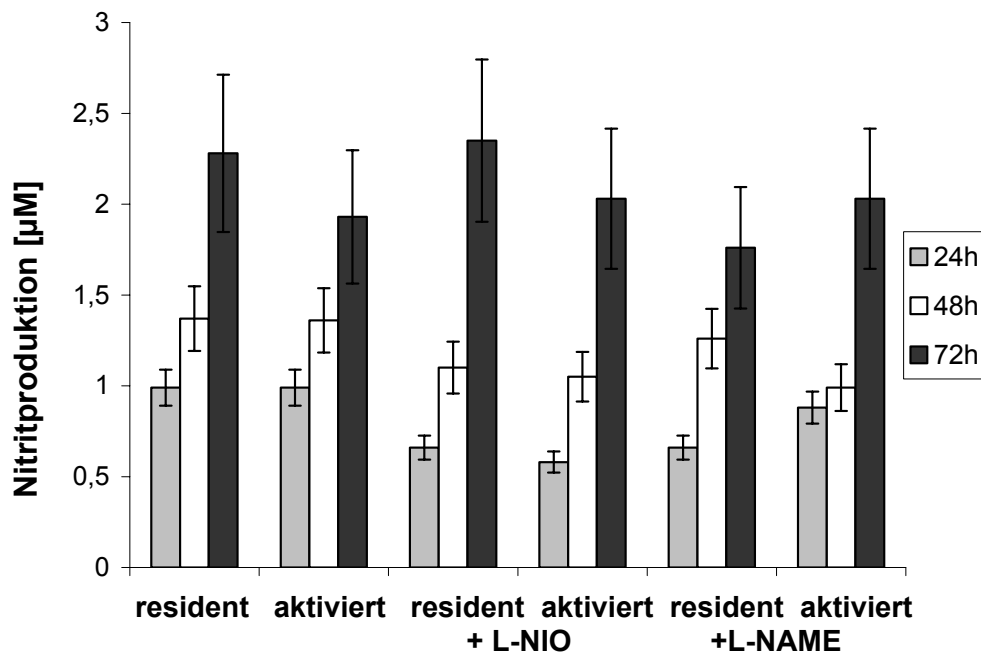


Abbildung 7: NOS 2 Inhibition in HepG2- Zellen

Die Nitritproduktion der NOS 2 in HepG2 wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ und unter Zugabe von L-NIO (5mM) oder L-NAME (5mM) bestimmt. Dazu wurden die Zellen 24,48 oder 72h lang aktiviert. Nicht-aktivierte Kontrollen mit den NOS-Inhibitoren wurden für 24, 48 und 72h mitgeführt und anschließend die Nitritmenge im Kulturüberstand mit Hilfe der Griess-Reaktion spektrophotometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Alle gemessenen Werte liegen im unteren Empfindlichkeitsbereich des Griess-Tests mit Auswirkungen auf die Genauigkeit der Messungen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich einerseits inhibierte Zellen von nicht inhibierten Zellen im Bezug auf die gemessene Nitritmenge nicht signifikant unterscheiden. Andererseits zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Inhibition von residenten und aktivierten Zellen.

3.1.2. AKN-Zellen

AKN-Zellen entstammen einer humanen epithelialen Leberzelllinie und wurden von Nüssler [75] charakterisiert. Zunächst sollte in gleicher Weise wie für HepG2-Zellen durch eine Grundcharakterisierung das Regulationsmuster nach Zytokinaktivierung dargestellt werden.

Die mRNA der NOS 2 bzw. der Arginase 1 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen. AKN-Zellen wurden für jeweils 4, 8, 12, 24, 36 und 48 h mit dem oben beschriebenen Zytokin-Mix inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen über 48h kultiviert. Anschließend wurde, wie für HepG2-Zellen beschrieben, die zelluläre mRNA isoliert und für die NOS 2 bzw. die Arginase 1 eine spezifische RT-PCR durchgeführt.

In den Versuchen konnte nach Zytokingabe ein NOS 2-mRNA-Signal nachgewiesen werden. Dabei kam es 12h nach Aktivierung zu einer maximalen Expression von $116\pm 14\%$. Anschließend fiel die NOS 2-Expression bis auf $79\pm 9\%$ nach 48h ab. In residenten AKN-Zellen fand sich ebenso wie in HepG2 ein schwaches Signal der NOS 2 m-RNA (Abb. 8).

Ein Signal der Arginase 1 m-RNA konnte selbst unter maximalen Zyklusbedingungen (>44 Zyklen) der spezifischen RT-PCR nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

Im Gegensatz zu HepG2-Zellen ist bei AKN-Zellen eine deutliche Nitrit-Produktion nach Aktivierung der Zellen erkennbar. Mit zunehmender Kulturzeit waren ansteigende Messwerte im Kulturüberstand nachzuweisen, die nach 48h maximale Werte von $8,0\pm 0,5\mu\text{M}$ erreichten. Dies entspricht der vierfachen Menge, die bei HepG2-Zellen zu messen war. In residenten Zellen konnte eine Nitritmenge von $2,95\pm 0,35\mu\text{M}$ gemessen werden (Abb. 10).

Nach der Harnstoffbestimmung konnte ebenso wie in HepG2-Zellen kein Mengenunterschied zwischen aktivierten und residenten Zellen gefunden werden. Nach 48h wurden in aktivierten AKN-Zellen $2,74\pm 0,21\text{mg/l}$ Harnstoff und in residenten AKN-Zellen $2,76\pm 0,11\text{mg/l}$ Harnstoff produziert (Daten nicht dargestellt).

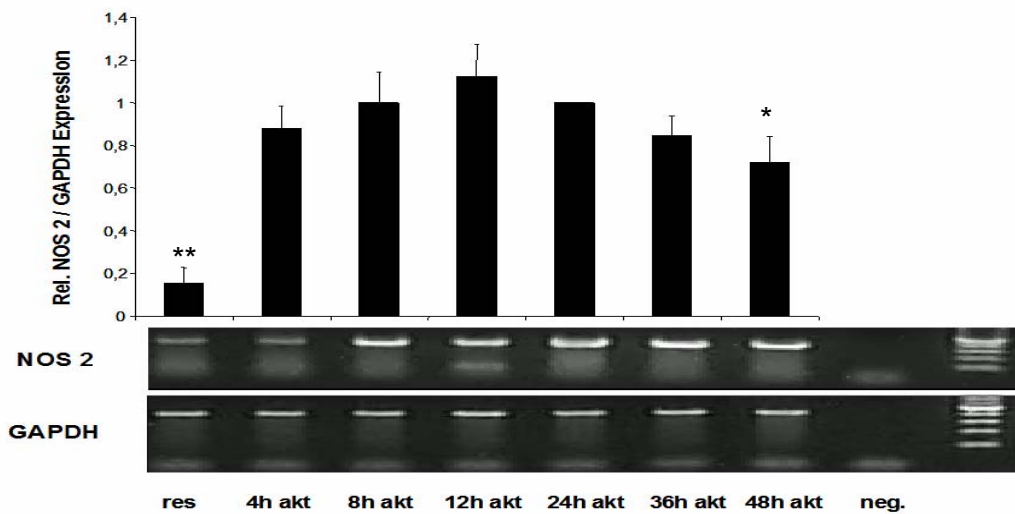


Abbildung 8: Zeitkinetik der NOS 2 m-RNA in AKN-Zellen

Die relative Expression der NOS 2- und GAPDH-mRNA in AKN-Zellen wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 4-48h lang aktiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine NOS 2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm bildet die relative NOS 2-mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH-mRNA Expression ab. Für NOS 2 wurde der für 24h berechnete Quotient auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ bezogen auf den 24h Wert). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen NOS 2 und GAPDH spezifischen RT-PCR-Probe dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits in residenten Zellen eine leichte Aktivierung der NOS 2 vorliegt. In aktivierten Zellen erreicht die NOS 2 nach 12h ihr Expressionsmaximum und fällt anschließend wieder ab.

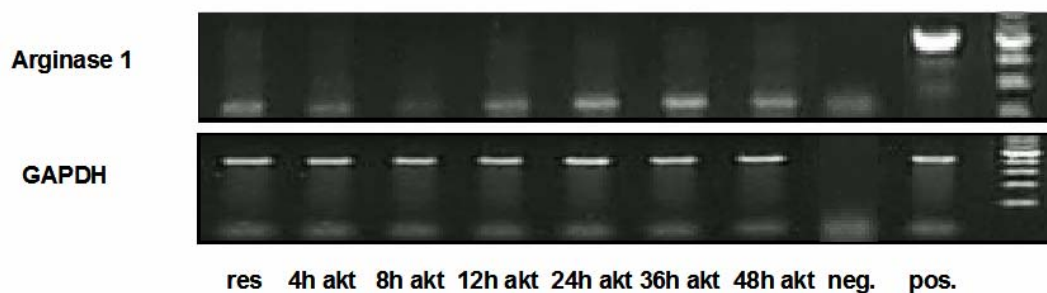


Abbildung 9: Zeitkinetik der Arginase 1 m-RNA in AKN Zellen

Die relative Expression der Arginase 1- und GAPDH mRNA in AKN-Zellen wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 4-48h lang aktiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine Arginase 1 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch bei hoher Zyklenzahl ($n > 44$) keine Banden in der elektrophoretischen Auftrennung für die Arginase 1 nachweisbar waren. Als Kontrolle (pos.) wurden HepG2-Zellen eingesetzt.

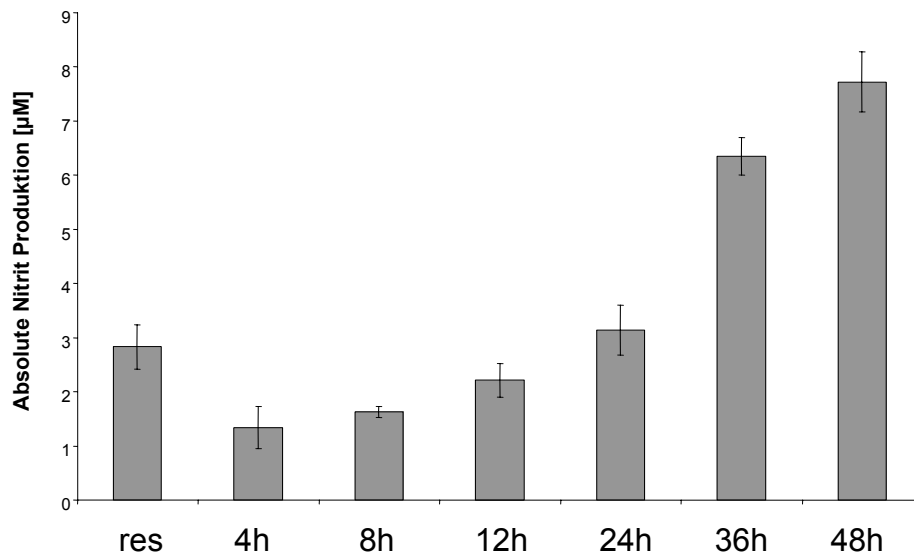


Abbildung 10: Zeitkinetik der Nitritproduktion von AKN-Zellen

Die Nitritproduktion der NOS 2 in AKN-Zellen wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 4,8,12,24,36 oder 48h lang aktiviert. Eine nicht-aktivierte Kontrolle wurde für 48h mitgeführt und anschließend die Nitritmenge im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Griess-Reaktion spektrophotometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Es zeigt sich im Verlauf der Aktivierung eine zunehmende Menge an Nitrit, die ihr Maximum mit 8,0 \pm 0,5 μ M nach 48h erreicht. In residenten Zellen wurden 2,95 \pm 0,35 μ M gemessen.

Ebenso wie in HepG2-Zellen war die Arginase 2 -, CAT 1- und CAT 2-mRNA bei AKN Zellen im Verlauf der Kulturzeit unverändert (Abb. 11 A, B, C).

Auf Proteinebene wird eine deutliche Zunahme des NOS 2 Proteins auf 83 \pm 7% nach 24h Aktivierung und 96 \pm 10% nach 48h Aktivierung sichtbar (Abb. 12). Gleichzeitig ist eine leichte Proteinexpression bei residenten Zellen von 37 \pm 2% zu erkennen. Der hier verwandte humane anti-NOS 2-Antikörper führte ebenso wie in HepG2-Zellen neben der charakteristischen NOS 2-Proteinbande zu einer Vielzahl weiterer uncharakteristischer Banden, so dass die Ergebnisse nur eine begrenzte Aussagekraft haben. Das Protein der Arginase ist in residenten Zellen mit 84 \pm 3% exprimiert. Nach Aktivierung vermindert sich die Expression nach 24h auf 80 \pm 6% und nach 48h auf 78 \pm 9% (Abb. 12).

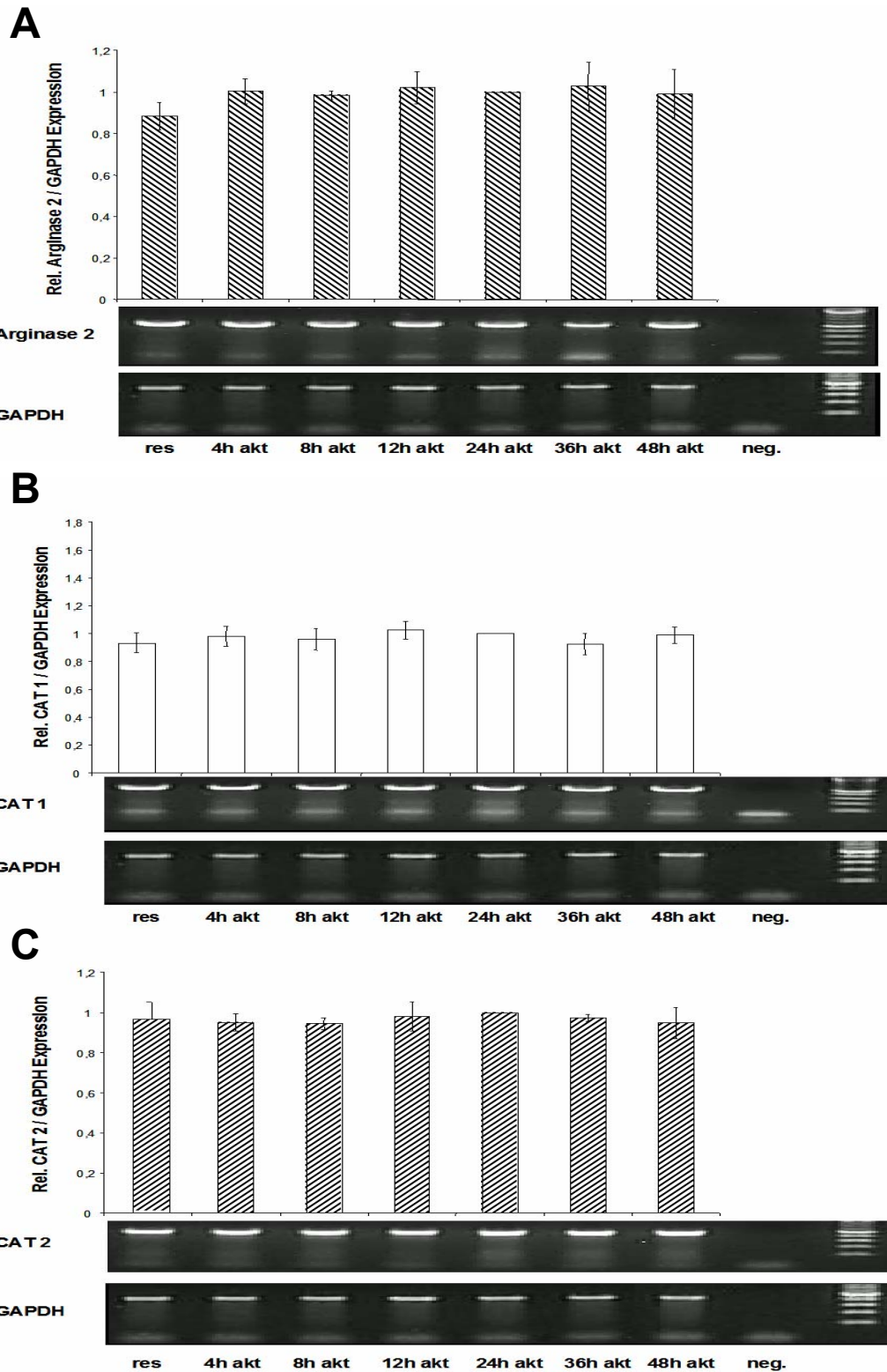


Abbildung 11: Zeitkinetik der Arginase 2- (A), CAT 1- (B) und CAT 2 (C) mRNA bei AKN-Zellen

Die relative Expression der Arginase 2- und GAPDH-, der CAT 1- und GAPDH- und der CAT 2- und GAPDH-mRNA in AKN-Zellen wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 4-48h lang aktiviert. Als Kontrolle wurden nicht

aktivierte AKN-Zellen mitgeführt. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine Arginase 2-, CAT 1- und CAT 2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm zeigt die relative Arginase 2-, CAT 1- und CAT 2-mRNA Expression im Vergleich zur GAPDH-mRNA Expression. Für alle Produkte wurde der für 24h berechnete Quotient auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen Arginase 2-, CAT 1- und CAT 2 und GAPDH spezifischen RT-PCR-Probe dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es in allen drei mRNA-Produkten zu keiner signifikanten Veränderung über die Zeit kommt.

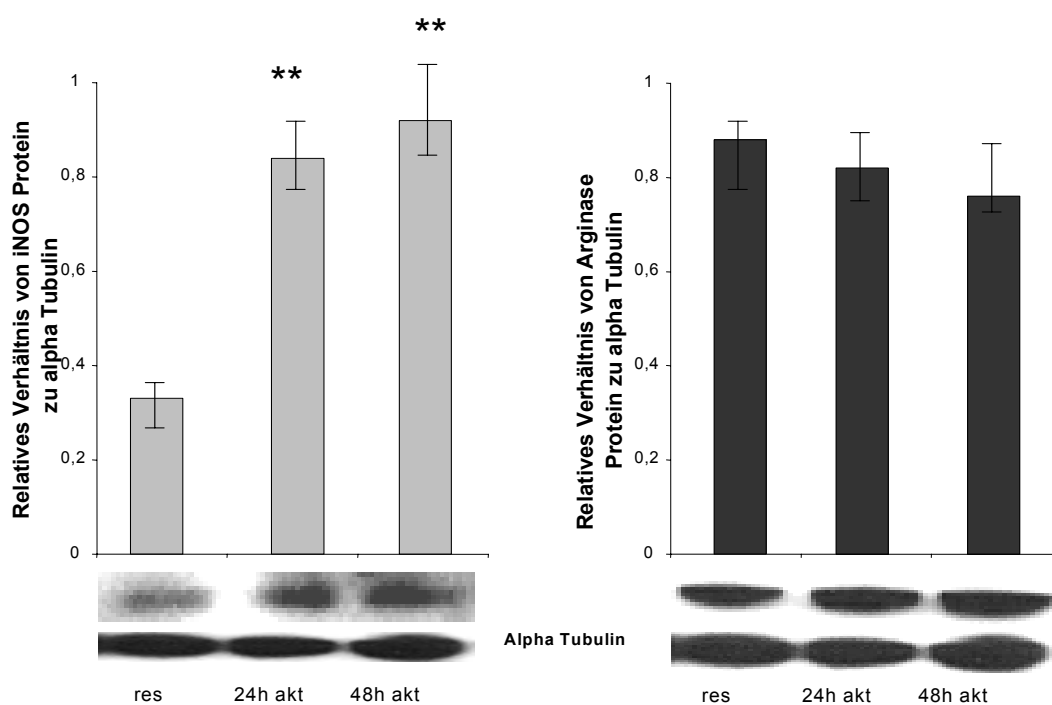


Abbildung 12: Proteinexpression von NOS 2 (A) und Arginase (B) in AKN-Zellen

Die relative Proteinexpression der NOS 2 und der Arginase in AKN-Zellen wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Dazu wurden die Zellen 24 oder 48h lang aktiviert. Anschließend wurde das zelluläre Protein isoliert und ein NOS 2- bzw. Arginase 1-spezifischer Western Blot durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm bildet die relative NOS 2- bzw. Arginase Proteinexpression im Vergleich zum durchgängig exprimierten α -Tubulin-Protein ab. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (** $p < 0,005$ bezogen auf residente Zellen). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen NOS 2 und α -Tubulin bzw. Arginase und α -Tubulin spezifischen Western Blot Probe dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits in residenten Zellen NOS 2-Protein exprimiert ist. Daneben kommt es über den Zeitraum von 48h nach Aktivierung zu einer signifikanten Zunahme der NOS 2-Aktivität. Die Expression des Arginase 1-Proteins nimmt im Vergleich zu residenten Zellen nicht signifikant ab.

Wie bereits beschrieben, produzieren AKN-Zellen nach Zytokinaktivierung NO. Um eine Hemmung der NOS 2-Aktivität untersuchen zu können, wurden ebenso wie bei den Versuchen mit HepG2-Zellen die NOS-Inhibitoren L-NIO und L-NAME eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass nach Zugabe von L-NIO (5mM) zu aktivierten Zellen eine nahezu vollständige Inhibition der NOS 2 erreicht werden konnte. Nach Zugabe von L-NAME (5mM) zeigte sich ebenfalls eine Inhibition, die jedoch im Vergleich mit L-NIO weniger ausgeprägt war (Tab. 1).

Durch L-Valin (20mM) konnte eine komplette Inhibition der Arginase erzielt werden, welche jedoch keine Auswirkungen auf die NOS 2-Aktivität hatte (Daten nicht dargestellt). Da in AKN-Zellen kein Transkriptionsprodukt der Arginase 1 nachgewiesen werden konnte, ist die gemessene Harnstoff-Konzentration einzig auf die Aktivität der Arginase 2 zurückzuführen.

	Residente Zellen	Aktivierte Zellen	Aktiviert + L-NIO	Aktiviert + L-NAME
24h Kulturzeit	0,8±0,03µM	5,50±0,55µM	1,18±0,04µM	1,24±0,03µM
48h Kulturzeit	1,18±0,02µM	6,24±0,40µM	1,66±0,04µM	2,38±0,04µM

Tabelle 1: Nitritproduktion in AKN-Zellen unter Zugabe von NOS Inhibitoren

Die Nitritproduktion der NOS 2 in AKN-Zellen wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1β + 1000U/ml TNF-α + 1000U/ml IFN-γ und unter Zugabe von L-NIO (5mM) oder L-NAME (5mM) bestimmt. Dazu wurden die Zellen 24 oder 48h lang aktiviert. Nicht-aktivierte Kontrollen mit den NOS-Inhibitoren wurden für 24 und 48h mitgeführt. Anschließend wurde die Nitritmenge im Kulturüberstand mit Hilfe der Griess-Reaktion spektrophotometrisch bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, welche aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt wurden.

Es zeigte sich eine effektive Inhibition der NOS 2-Aktivität durch L-NIO nach Kultivierung für 24 bzw. 48h. L-NAME führte zu einer starken Inhibition 24h nach Aktivierung. Nach 48h schwächte sich der inhibitorische Effekt wieder ab.

3.2. Charakterisierung der Rattenhepatozyten

Nach der Untersuchung von humanen Zelllinien sollen in den folgenden Versuchen Rattenhepatozyten untersucht werden. Dabei ist zunächst wieder die auch bei humanen Zellen durchgeführte Grundcharakterisierung von Interesse.

Ähnlich den Kulturbedingungen von humanen Zellen sind Rattenhepatozyten nach Isolation und Aufarbeitung für bis zu 72h mit einem Zytokinmix aus 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IL1- β + 1000U/ml IFN- γ inkubiert worden. Als Kontrolle wurden nicht-aktivierte Zellen eingesetzt. Die mRNA der NOS 2, der Arginasen und der CATs wurden mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen. Dabei wurde die zelluläre mRNA isoliert und für das durchgängig exprimierte Enzym GAPDH und die NOS 2, die Arginasen oder die CATs eine spezifische RT-PCR durchgeführt. Im Anschluss daran wurde, wie bei den Untersuchungen zu humanen Zellen beschrieben, aus den densitometrischen Daten der Quotient von mRNA-Produkt und GAPDH gebildet (z.B. NOS 2/ GAPDH). Der Quotient des 24h-Wertes wurde für die NOS 2 und die CATs auf 100% normiert. Für die Arginase 1 wurde der Quotient der nicht-aktivierten Zellen auf 100% normiert. Davon ausgehend wurde die prozentuale Expression der mRNA zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

NOS 2-mRNA ist in residenten Zellen nicht vorhanden. 4h nach Aktivierung ist erstmals NOS 2-mRNA mit einer relativen Expression von $80 \pm 5\%$ nachweisbar. Eine Expression von 100% wird nach 24h (Abb. 13 A). Das NOS 2-Protein wird in schwacher Expression ($22 \pm 2\%$) bereits in residenten Zellen gefunden. In aktivierten Zellen findet man nach 72h eine relative Expression von $98 \pm 6\%$ (Abb. 13 C).

Die Nitritproduktion erreicht 4h nach Zytokinaktivierung $14 \pm 2 \mu\text{M}$ und nimmt während der Kultivierungszeit weiter zu. Nach 24h werden bis zu $95 \pm 18 \mu\text{M}$ und nach 72h $170 \pm 24 \mu\text{M}$ Nitrit produziert (Tab. 2).

Arginase 1-mRNA ist in residenten Hepatozyten am stärksten exprimiert. Nach 4-24h Aktivierung verringert sich die Expression auf den Minimalwert von $40 \pm 9\%$ (Abb. 13 B). Für das Protein der Arginase 1 konnte eine Expressionsreduktion nachgewiesen werden (relative Expression in residenten Zellen $212 \pm 17\%$ und $127 \pm 9\%$ in Zellen 72h nach Aktivierung) (Abb. 13 D).

In Bezug auf die Harnstoffproduktion, gemessen im Zellkulturüberstand, gibt es zwischen residenten und aktivierten Zellen während der Beobachtungszeit keinen signifikanten Unterschied. (Tab. 2).

Die m-RNA der Arginase 2 (Daten nicht dargestellt) und die mRNA der beiden kationischen Aminosäuretransporter CAT 1 und CAT 2 sind in residenten Zellen vorhanden. Nach Aktivierung der Zellen kommt es zu keiner Änderung der Expression (Abb. 13 E, F).

Kulturzeit nach Aktivierung	Nitritmenge [μM]	Harnstoffmenge in mg/l	
	Aktivierte Zellen	Aktivierte Zellen	(Residente Zellen)
4h	14 \pm 2	117 \pm 11	(112 \pm 20)
24h	95 \pm 20	763 \pm 63	(882 \pm 48)
72h	170 \pm 24	2085 \pm 23	(1887 \pm 435)

Tabelle 2: Nitrit- und Harnstoffproduktion in Rattenhepatozyten

Angegeben ist die im Zellüberstand gemessene Menge an Nitrit bzw. Harnstoff mittels der Griess-Reaktion bzw. Berthelot-Reaktion. Die angegebenen Daten beziehen sich auf 1×10^5 Zellen pro ml Medium und Kulturplatte. In residenten Zellen konnte kein Nitrit gemessen werden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Die Nitritproduktion erreicht 4h nach Zytokinaktivierung 14 \pm 2 μM und nimmt während der Kultivierungszeit weiter zu. Nach 24h wurden bis zu 95 \pm 20 μM und nach 72h 170 \pm 24 μM Nitrit produziert. Zwischen residenten und aktivierten Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Harnstoffproduktion.

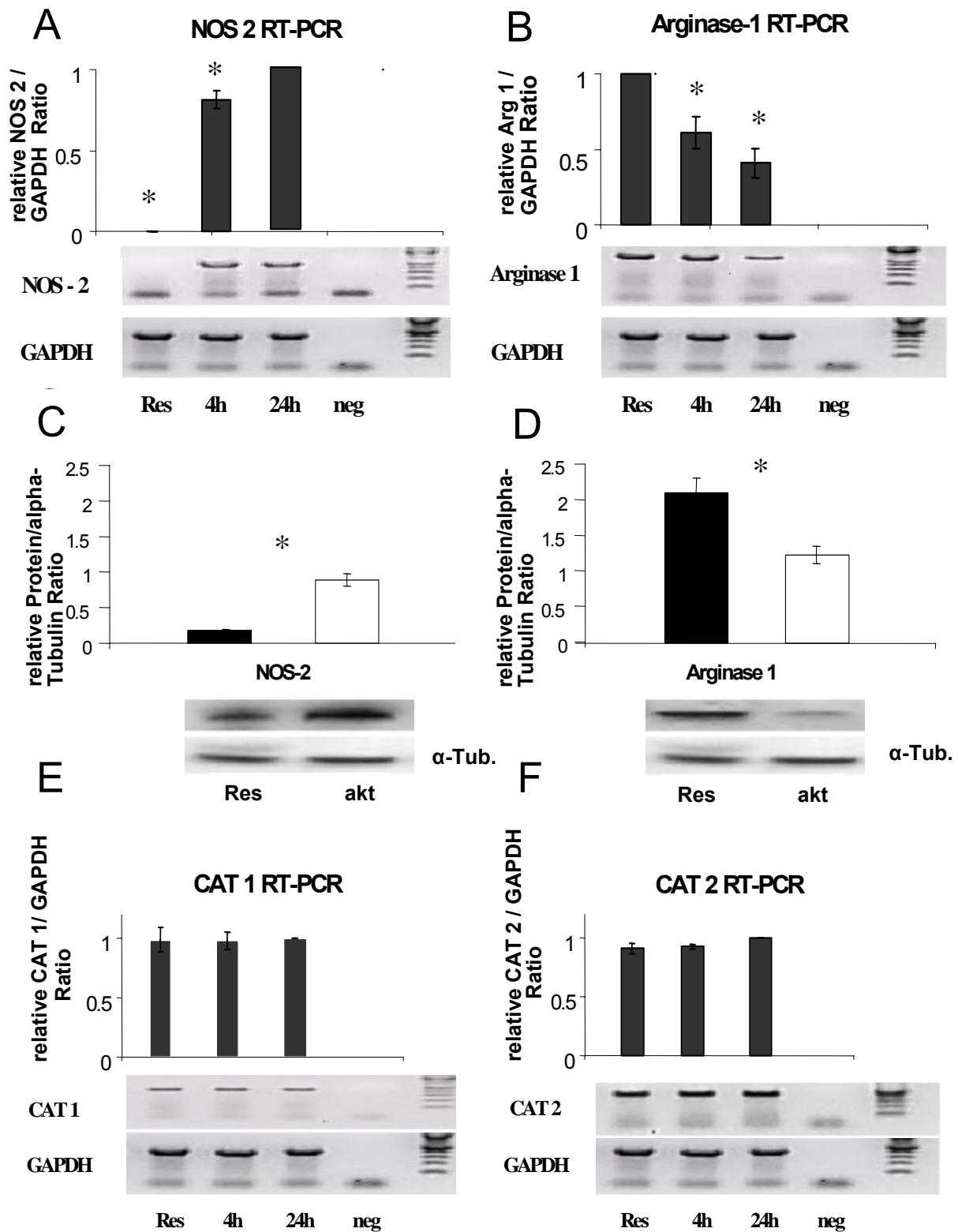


Abbildung 13: Charakterisierung der Rattenhepatozyten: (A) NOS 2 m-RNA, (B) Arginase 1 m-RNA, (C) NOS 2- und (D) Arginase 1 Protein sowie (E) CAT 1 m-RNA und (F) CAT 2 m-RNA.

A-F: Die relative Expression der NOS 2- und GAPDH-, Arginase1- und GAPDH, der CAT 1- und GAPDH- und der CAT 2- und GAPDH-mRNA in Rattenhepatozyten wurde nach Inkubation mit 1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ bestimmt. Für die Bestimmung der mRNA wurden die Zellen 4-24h lang aktiviert und für die Proteinbestimmung 72h. Als Kontrolle dienten nicht aktivierte Rattenhepatozyten. Anschließend wurde die mRNA isoliert und eine NOS 2-, Arginase 1-, Arginase 2-, CAT 1- und CAT 2 und GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Das jeweilige Balkendiagramm bildet die relative NOS 2-, Arginase 1-, CAT 1- und CAT 2-mRNA-Expression im Vergleich zur GAPDH-mRNA-Expression ab. Für alle Produkte (außer der Arginase 1 residente Expression=100%) wurde der für 24h berechnete Quotient auf 100% normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf den 24h Wert bei der NOS 2 bzw. residente Zellen bei der Arginase 1). Unter dem Balkendiagramm ist die elektrophoretische Auftrennung einer repräsentativen NOS 2-, Arginase 1-, CAT 1- und CAT 2 und GAPDH spezifischen RT-PCR-Probe dargestellt. Für die Proteinbestimmung der NOS 2 und der Arginase 1 bilden die Balkendiagramme die relative NOS 2 und α -Tubulin- bzw. Arginase 1 und α -Tubulin Proteinexpression nach 72h Aktivierung ab. NOS 2-mRNA ist in residenten Zellen nicht vorhanden. 4h nach Aktivierung ist erstmals NOS 2-mRNA mit einer relativen Expression von $80 \pm 5\%$ nachweisbar. Die maximale Expression nach 24h erreicht den absoluten Wert von $95 \pm 20\%$. Arginase 1-mRNA verringert sich nach 4- 24h Aktivierung auf maximal $40 \pm 9\%$. Die m-RNA der beiden kationischen Aminosäuretransporter CAT 1 und CAT 2 ist in residenten Zellen vorhanden. Nach Aktivierung der Zellen kommt es zu keiner Änderung der Expression. NOS 2-Protein war bereits schwach in residenten Zellen exprimiert ($22 \pm 2\%$). Nach 72 h kam es zu einer relativen Erhöhung auf $98 \pm 6\%$. Die Expression des Arginase 1-Proteins nahm nach 72h Aktivierung deutlich ab auf $127 \pm 9\%$ (residente Zellen $212 \pm 17\%$).

3.3. Inhibition der NOS 2 bei Rattenhepatozyten

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die verstärkte NO-Produktion in Rattenhepatozyten nach Zytokinaktivierung inhibierbar und somit spezifisch für die NOS 2 ist. Dafür wurden aktivierte Zellen für 24 bzw. 48h unter Zugabe von L-NIO (5mM) bzw. L-NAME (5mM) kultiviert. Unter Zugabe von NIO wurden nach 24h (48h) Aktivierung noch $19\pm 16\mu\text{M}$ ($22\pm 14\mu\text{M}$) Nitrit produziert. Dies entspricht einer Hemmung von 80% (82%). L-NAME Zugabe führte zu einer Nitrit-Produktion von $47\pm 12\mu\text{M}$ ($55\pm 14\mu\text{M}$), welches einer Hemmung von 51% (54%) nach 24h (48h) Aktivierung entspricht (Abb. 14). L-NIO stellt sich bei Rattenhepatozyten als ein potenter Inhibitor der NOS 2 dar. L-NAME inhibiert die Nitrit-Produktion weniger effektiv.

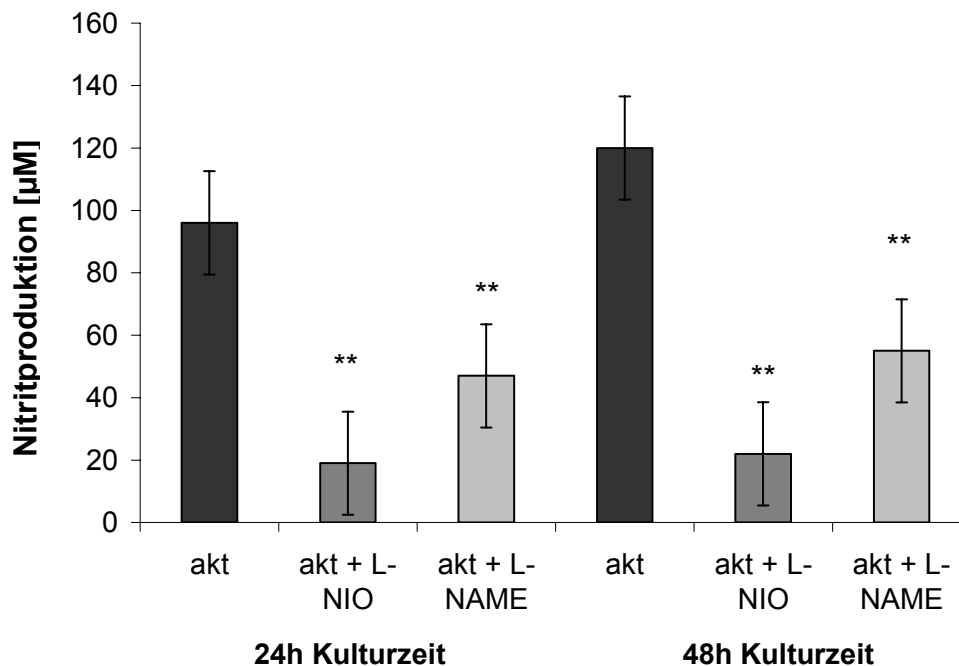


Abbildung 14: NOS 2 Inhibition mit L-NIO bzw. L-NAME

Die Nitritproduktion der NOS 2 in Rattenhepatozyten wurde nach Inkubation mit $1000\text{U/ml IL-1}\beta$ + $1000\text{U/ml TNF-}\alpha$ + $1000\text{U/ml IFN-}\gamma$ und unter Zugabe von L-NIO (5mM) oder L-NAME (5mM) bestimmt. Dazu wurden die Zellen 24 oder 48h lang aktiviert. Nicht-aktivierte Kontrollen mit den NOS-Inhibitoren wurden für 24, 48h mitgeführt. Anschließend wurde die Nitritmenge im Kulturüberstand mit Hilfe der Griess-Reaktion spektrophotometrisch bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, welche aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt wurden (** $p < 0,005$ bezogen auf aktivierte Zellen ohne Inhibitoren). Es zeigt sich eine effektive Inhibition der NOS 2 durch L-NIO nach 24 und 48h Kultur. L-NAME führt zu einer starken Inhibition 24h nach Aktivierung. Nach 48h schwächt sich der inhibitorische Effekt leicht ab.

3.4. Variation der L-Arginin-Konzentration im Kulturmedium von Rattenhepatozyten

Neben der unphysiologisch hohen L-Arginin-Konzentration von 1mM im Kulturmedium wurden in den folgenden Versuchen die L-Arginin-Konzentrationen variiert, wobei alle anderen Parameter der Zellkultur beibehalten wurden. Dabei wurden Konzentrationen von 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000µM L-Arginin gewählt. Rattenhepatozyten wurden nach der Isolation zunächst für 24h unbehandelt und danach für weitere 24h in L-Arginin-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aktiviert und entsprechend der angeführten L-Arginin-Konzentrationsreihe im Zellmedium für 24h kultiviert.

Dabei zeigte sich, dass nach Aktivierung der Hepatozyten die NO-Produktion von der L-Arginin-Konzentration im Medium abhängig ist (Abb. 15). Bei einer Konzentration von 10µM L-Arginin im Medium wurden lediglich 20% der NO-Menge produziert, die bei einer L-Arginin-Konzentration von 1mM gemessen wurde. Im physiologischen Konzentrationsbereich von 80-200µM L-Arginin wurden zwischen 30 und 50% der NO Menge produziert. Die Produktion von Harnstoff war ebenfalls abhängig von der vorhandenen L-Arginin-Konzentration im Kulturmedium. So wurden bei einer Konzentration von 100µM L-Arginin lediglich zwischen 25 und 50% der Harnstoffmenge produziert, die bei einer L-Arginin-Konzentration von 1mM nachgewiesen wurde. Zwischen residenten und aktivierten Zellen zeigte sich in der Harnstoffproduktion kein signifikanter Unterschied innerhalb der eingesetzten L-Arginin-Konzentrationen.

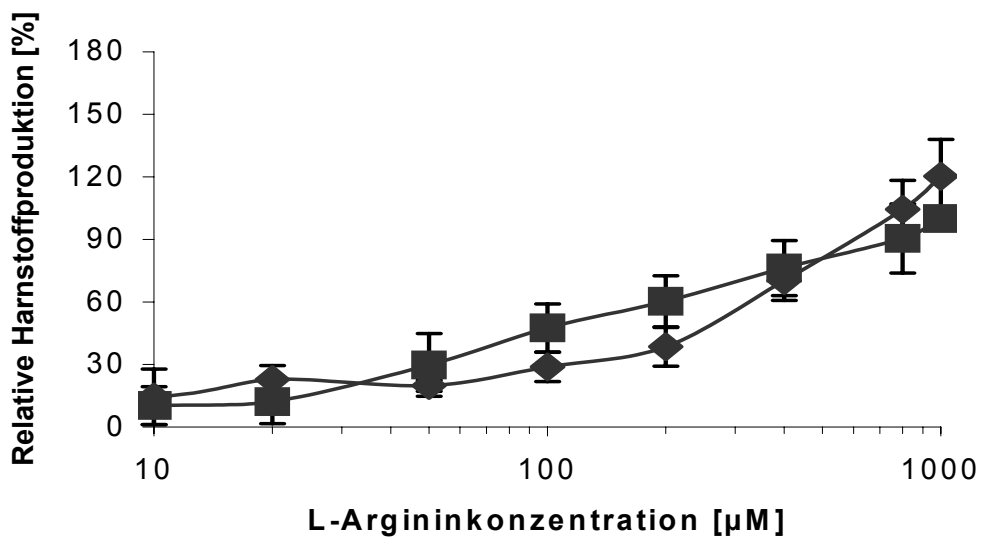
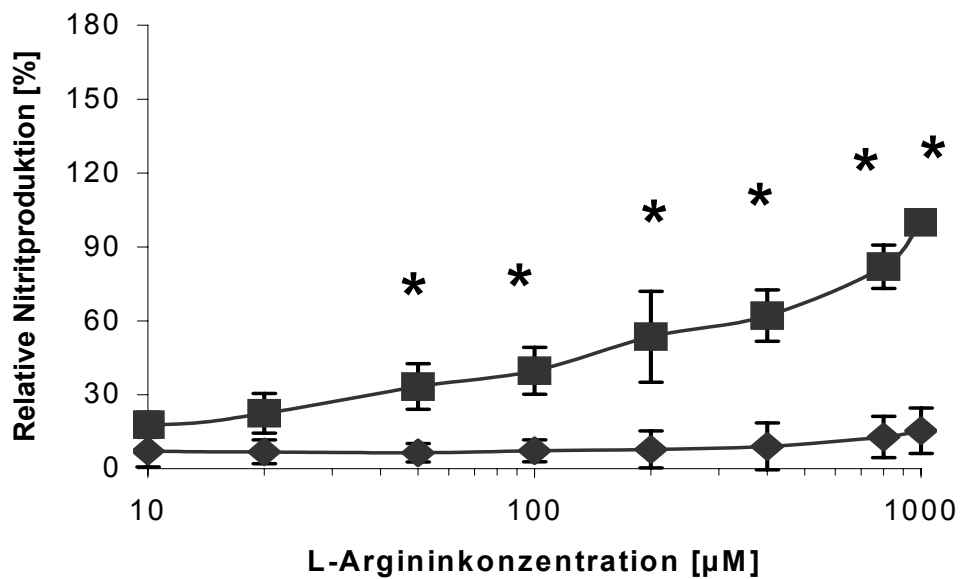


Abbildung 15: Relative Nitrit- und Harnstoffproduktion in aktivierten (■) und residenten (◆) Rattenhepatozyten bei variablen L-Arginin-Konzentrationen.

Hepatozyten wurden zunächst 24h in L-Arginin-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aktiviert (1000U/ml IL-1 β + 1000U/ml TNF- α + 1000U/ml IFN- γ) und entsprechend der exogenen L-Arginin-Konzentration im Zellmedium (10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000 μ M) für weitere 24h kultiviert. Nicht-aktivierte Kontrollen wurden in den gleichen Konzentrationen für 24h kultiviert. Die Nitritmenge im Kulturüberstand wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion und die Harnstoffmenge mit Hilfe der Berthelot-Reaktion spektrophotometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$ bezogen auf residente Zellen). In residenten Zellen (◆) ist nur eine geringe mit steigender L-Arginin-Konzentration leicht zunehmende Nitritmenge nachzuweisen. In Zytokin-aktivierten Zellen kommt es zu einem Anstieg der Nitritproduktion abhängig von der L-Arginin-Konzentration im Medium. Für die

höchste L-Arginin-Konzentration wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20\mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen (=100%). Die Harnstoffproduktion steigt in ähnlicher Weise mit zunehmender L-Arginin-Konzentration, jedoch ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen residenten (\blacklozenge) und aktivierten Hepatozyten (\blacksquare). Dabei entsprechen 100% einer Harnstoffkonzentration von $763 \pm 45\mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) in aktivierten Zellen.

3.5. Modulation der Nitrit- und Harnstoffproduktion in Rattenhepatozyten durch Zugabe von Aminosäuren

3.5.2. Inhibition der Arginase mit L-Valin

Durch die Zugabe von L-Valin ist es möglich einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die Arginase auszuüben. Aufgrund der postulierten Interaktion zwischen den beiden Enzymen NOS 2 und Arginase 1 war es von Interesse zu untersuchen, ob eine Inhibition der Arginase zu einer verstärkten Produktion von NO führt.

Zu diesem Zweck wurde zu den verschiedenen L-Arginin-Konzentrationen zusätzlich L-Valin in einer Konzentration von 20mM hinzu gegeben. Dabei zeigte sich, dass die Arginase bis zu einer L-Arginin-Konzentration von 400 μM vollständig inhibiert werden konnte (Abb. 16). Bei 800 und 1000 μM L-Arginin im Medium wurde eine Inhibition von bis zu 70% im Verhältnis zu aktivierten Zellen ohne L-Valin erreicht. Die Menge an Nitrit nahm jedoch durch die Arginase-Inhibition in Konzentrationsbereichen erst bei exogenen Konzentrationen ab 400 μM L-Arginin signifikant zu. Dabei wurde bei einer Konzentration von 400 μM bzw. 800 μM L-Arginin im Medium bei L-Valinzugabe die doppelte Menge an NO gemessen im Vergleich zu aktivierten Zellen ohne L-Valinzugabe. Bei der maximalen Konzentration von 1000 μM wurde durch die Zugabe von L-Valin eine Steigerung der NO-Produktion um 30% erreicht.

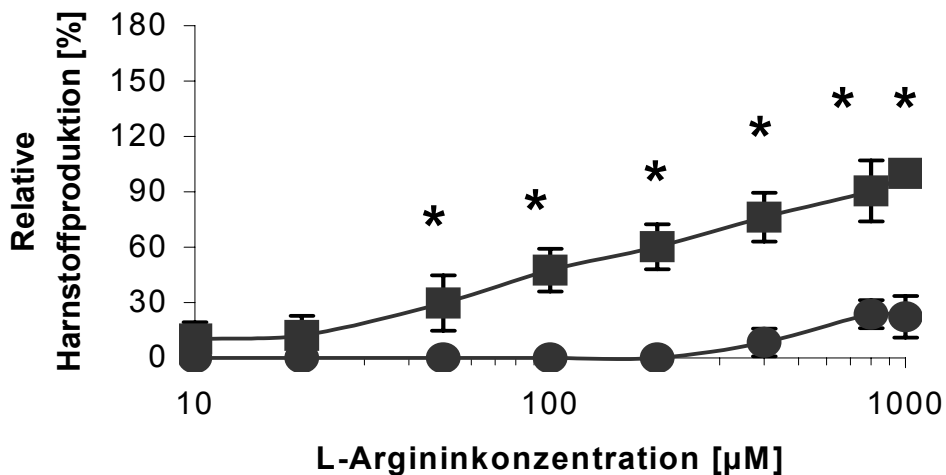
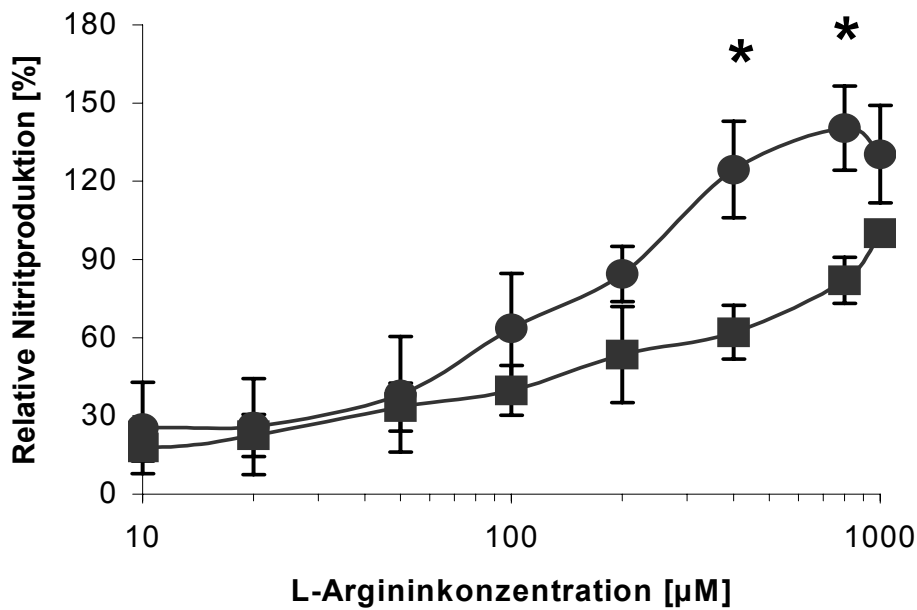


Abbildung 16: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Valin (●).

Hepatozyten wurden, wie unter Abbildung 15 beschrieben, behandelt, aktiviert und mit L-Valin [20mM] supplementiert. Für die höchste L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen (■) (=100%) wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen. Eine Harnstoffproduktion von 100% in aktivierten Hepatozyten entspricht $763 \pm 45 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf einen signifikanten Unterschied derselben L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen mit und ohne L-Valin). Es zeigte sich, dass die Harnstoffproduktion innerhalb der gesamten Konzentrationsbreite deutlich vermindert war und dass die Nitritmenge ab einer L-Arginin-Konzentration von $400 \mu\text{M}$ ($400 \mu\text{M}$ $124 \pm 18\%$; $800 \mu\text{M}$ $140 \pm 16\%$) unter Hinzugabe von L-Valin gesteigert war.

3.5.2. Kompetitive Inhibition des L-Arginin-Transports mit L-Lysin

Neben der direkten Inhibition der Arginase durch L-Valin besteht eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme über die kationischen Aminosäuretransporter (CAT). Durch die Zugabe von L-Lysin im Überschuss (20mM) ist es möglich eine kompetitive Hemmung der kationischen Aminosäuretransporter zu erzielen und dadurch den Transport von L-Arginin in die Zelle zu hemmen.

Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, dass L-Lysin eine Hemmung der Arginase-Aktivität bewirkte. Bis zu einer Konzentration von 20 μ M L-Arginin im Medium konnte die Arginase durch L-Lysin vollständig gehemmt werden. Im physiologischen Konzentrationsbereich von L-Arginin (80-200 μ M) bewirkte L-Lysin eine 50%ige Hemmung der Arginase und bei supraphysiologischen Konzentrationen lag die Hemmung bei über 60%. Außer bei der Konzentration von 1000 μ M L-Arginin, bei der signifikant höhere Mengen an NO gebildet wurden, ließ sich die NO-Produktion durch die Zugabe von L-Lysin zum Kulturmedium nicht beeinflussen (130 \pm 18%) (Abb. 17).

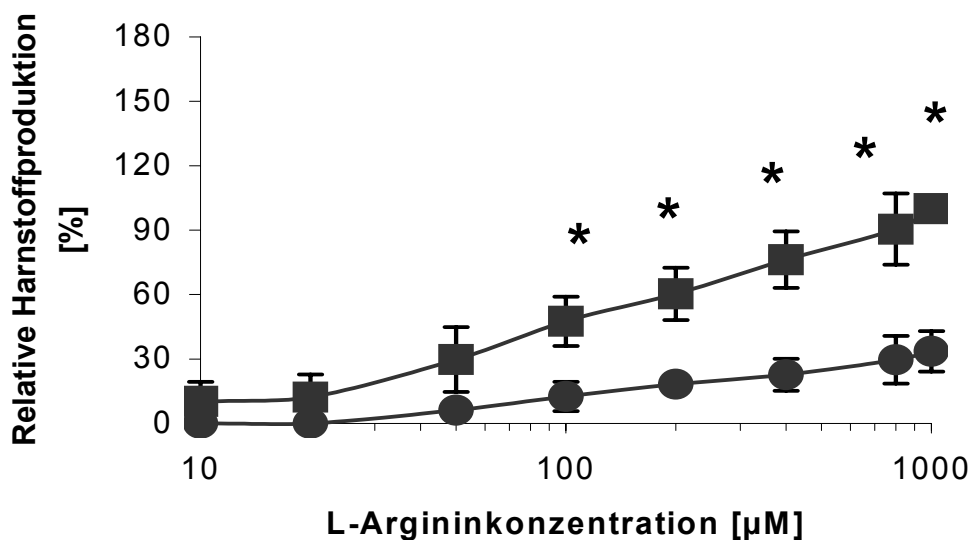
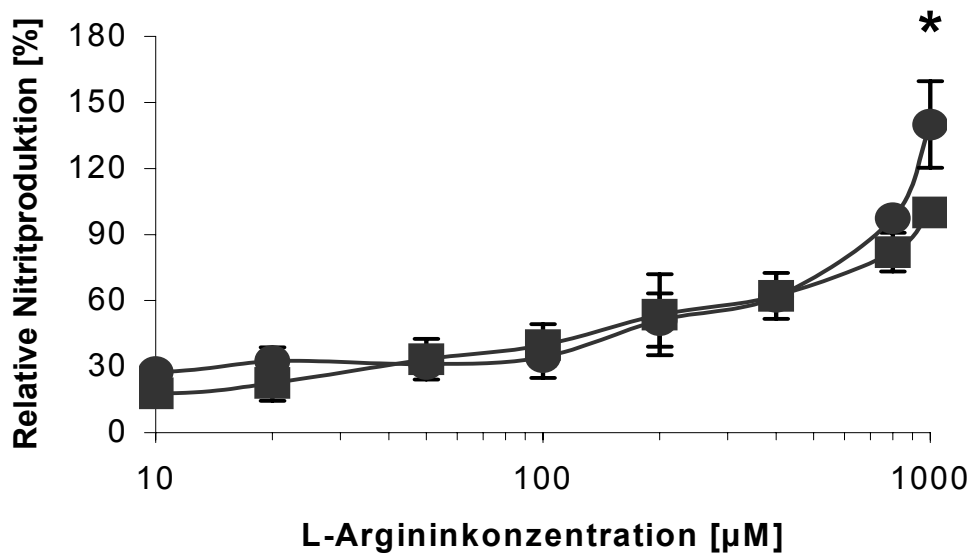


Abbildung 17: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Lysin (●).

Hepatozyten wurden, wie unter Abbildung 15 beschrieben, behandelt, aktiviert und mit L-Lysin [20mM] supplementiert. Für die höchste L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen (■) (=100%) wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen. Eine Harnstoffproduktion von 100% in aktivierten Hepatozyten entspricht $763 \pm 45 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf einen signifikanten Unterschied derselben L-Arginin-Konzentrationen in aktivierten Zellen mit und ohne L-Lysin). Mit Ausnahme der höchsten L-Arginin-Konzentration kam es zu keiner nennenswerten Änderung der Nitritproduktion, dagegen war die Harnstoffproduktion ab einer L-Arginin-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ signifikant vermindert.

3.5.3. Produkthemmung der Arginase-Aktivität durch L-Ornithin

L-Ornithin ist ein Metabolit des Harnstoffzyklus und wird bei der Reaktion von L-Arginin mit der Arginase produziert. Daneben nutzt L-Ornithin kationische Aminosäuretransporter für den Transport in die Zelle. Durch eine Zugabe von L-Ornithin (20mM) zum Kulturmedium sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine Produkthemmung der Arginase und eine kompetitive Hemmung der kationischen Aminosäuretransporter auf die NOS 2-Aktivität haben.

In den Versuchen zeigte sich, dass L-Ornithin zu einer moderaten Inhibition der Arginase führt, die allerdings mit Ausnahme der hohen L-Arginin-Konzentrationsbereiche (ab 400 μ M) nicht signifikant ist (Abb. 18). Im Gegensatz dazu hat L-Ornithin einen maßgeblichen Effekt auf die NO-Produktion. Bei minimalen L-Arginin-Konzentrationen (10 μ M) konnten bereits maximale Nitrit-Mengen von 90 \pm 14% gemessen werden (Abb. 18). Dieser Effekt hält sich konstant in allen subphysiologischen und physiologischen Konzentrationsbereichen von L-Arginin. In supraphysiologischen Konzentrationsbereichen von L-Arginin werden bis zu 30% gesteigerte Nitrit-Spiegel relativ zu den Werten ohne Zusatz von L-Ornithin gefunden.

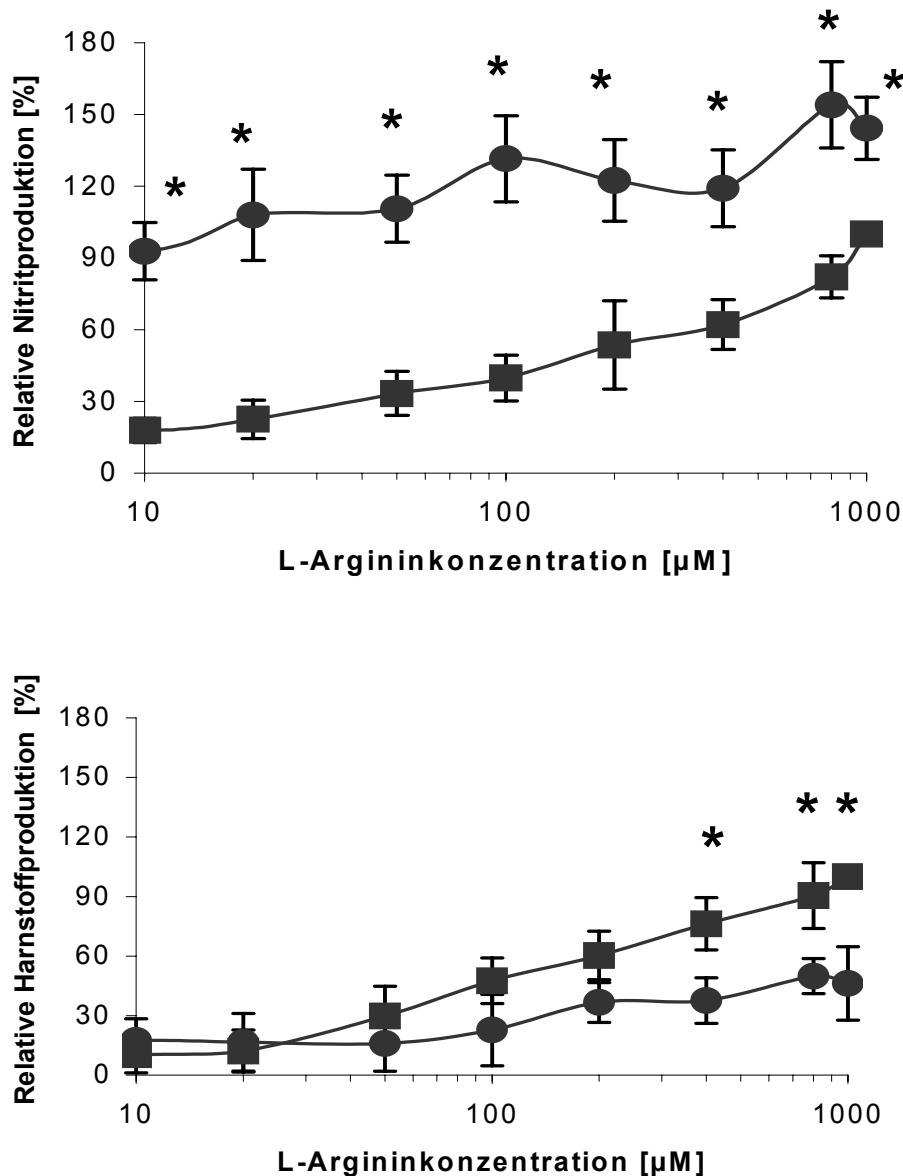


Abbildung 18: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Ornithin (●).

Hepatozyten wurden, wie unter Abbildung 15 beschrieben, behandelt, aktiviert und mit L-Ornithin [20mM] supplementiert. Für die höchste L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen (■) (=100%) wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen. 100% Harnstoffproduktion in aktivierten Hepatozyten entsprechen $763 \pm 45 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf einen signifikanten Unterschied derselben L-Arginin-Konzentrationen in aktivierten Zellen mit und ohne L-Ornithin). Es zeigt sich eine -vor allem bei niedrigen L-Arginin-Konzentrationen- signifikant gesteigerte Nitritproduktion. Bereits bei einer L-Arginin-Konzentration von $20 \mu\text{M}$ wurden $108 \pm 19\%$ Nitrit produziert. Die Harnstoffmenge ist bei L-Arginin-Konzentrationen bis $200 \mu\text{M}$ nicht verändert. Erst ab einer Konzentration von $400 \mu\text{M}$ kommt es zu einer signifikanten Verminderung.

3.5.4. Kombination von Produkthemmung und Transportkompetition durch kombinierte Gabe von L-Lysin und L-Ornithin

Durch die Zugabe von L-Lysin und L-Ornithin sollten die additiven Effekte der einzelnen Aminosäuren untersucht werden. Beide Aminosäuren bewirken eine kompetitive Hemmung der kationischen Aminosäuretransporter. Zusätzlich führt L-Ornithin zu einer Produkthemmung der Arginase.

Dabei zeigte sich, dass mit dieser Kombination eine vollständige Inhibition der Arginase über alle Konzentrationsbereiche möglich ist (Abb. 19). Lediglich bei hohen L-Arginin-Konzentrationen kam es zu einer 10%igen Aktivität der Arginase. Darüber hinaus wurde die NO Menge, die bereits bei der alleinigen Zugabe von L-Ornithin maximale Werte bei geringen L-Arginin-Konzentrationen aufwies, weiter gesteigert. Beispielsweise wurden bei einer Mediumkonzentration von 10 μ M L-Arginin unter Zugabe von L-Lysin und L-Ornithin bereits 20% mehr Nitrit gebildet als bei aktivierten Zellen unter der maximalen L-Arginin-Konzentration. Bei der hohen Konzentration von 1000 μ M L-Arginin wurden unter Zugabe der beiden Amine bis zu 80% mehr Nitrit gebildet.

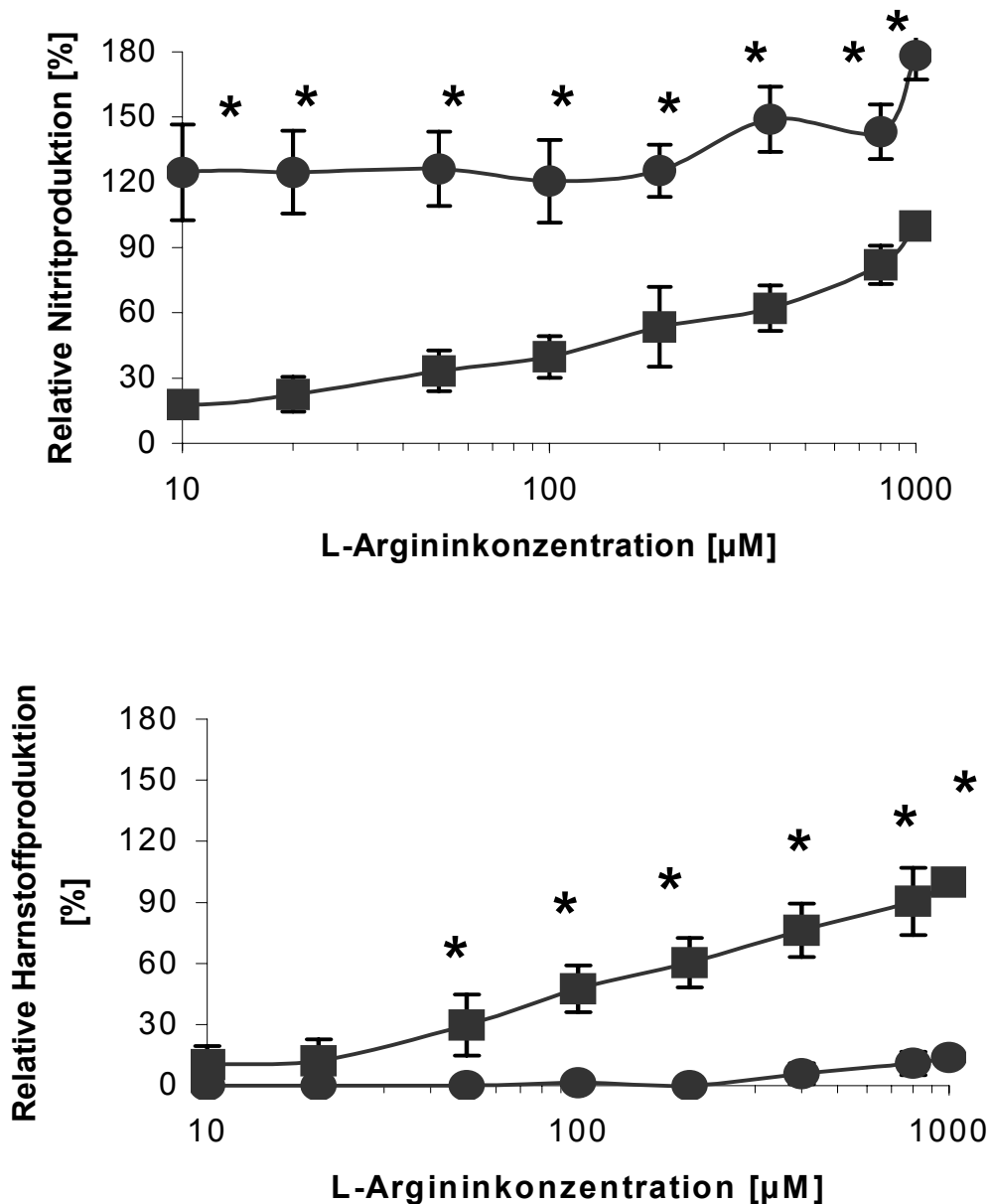


Abbildung 19: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Ornithin und L-Lysin (●).

Hepatozyten wurden, wie in Abbildung 15 beschrieben, behandelt, aktiviert und mit L-Ornithin und L-Lysin [jeweils 20mM] supplementiert. Für die höchste L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen (■) (=100%) wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen. 100% Harnstoffproduktion in aktivierten Hepatozyten entsprechen $763 \pm 45 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h).

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf einen signifikanten Unterschied derselben L-Arginin-Konzentrationen in aktivierten Zellen mit und ohne L-Lysin und L-Ornithin). Ähnlich der Zugabe von L-Ornithin zeigt sich eine -vor allem bei niedrigen L-Arginin-Konzentrationen- signifikant gesteigerte Nitrit-Produktion. Es werden bei einer L-Arginin-Konzentration von $20 \mu\text{M}$ $124 \pm 22\%$ Nitrit produziert. Die Harnstoffmenge ist ab einer L-Arginin-Konzentrationen $50 \mu\text{M}$ signifikant vermindert.

3.5.5. Inhibition der NOS 2 durch L-Arginin-Analoga (L-NIO, L-NAME)

L-NIO

Neben den Versuchen die L-Arginin-Zufuhr in die Zellen bzw. dessen Metabolisation im Harnstoffzyklus zu beeinflussen, wurde durch die Inhibition der NO Synthese versucht Einfluss auf die Harnstoffproduktion bzw. auf die Aktivität der Arginase zu nehmen.

Dazu wurde L-NIO, ein spezifischer Inhibitor der NOS 2, in einer Konzentration von 5mM zu aktivierten Zellen hinzugefügt. Dabei zeigte sich, dass mit Hilfe dieses Inhibitors eine effektive Blockade der NO-Produktion über die gesamte L-Arginin-Konzentrationsreihe möglich ist. Die Aktivität der Arginase wurde allerdings nur bei einer hohen L-Arginin-Konzentration (800, 1000 μ M) beeinflusst. Bei geringeren Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Effekt (Abb. 20).

L-NAME

In einem weiteren Versuch wurde der unspezifische NOS-Inhibitor L-NAME in einer Konzentration von 5mM zu aktivierten Zellen hinzugefügt. Dabei war zu beobachten, dass der Hemmeffekt auf die NO-Produktion durch L-NAME geringer ausgeprägt war als bei L-NIO. Bei niedrigen L-Arginin-Konzentrationen (bis 200 μ M) zeigte sich keine effektive NOS 2-Inhibition. Erst bei höheren Konzentrationen ab 400 μ M L-Arginin konnte ein signifikanter Effekt dargestellt werden. Dagegen kam es bereits bei L-Arginin-Konzentrationen von 50 μ M zu einer signifikanten Inhibition der Arginase. Bis zur Konzentration von 100 μ M konnte die Arginase vollständig gehemmt werden (ohne Signifikanz). Bei höheren Konzentrationen wurde eine Hemmung zwischen 60 und 80% erreicht (Abb. 21).

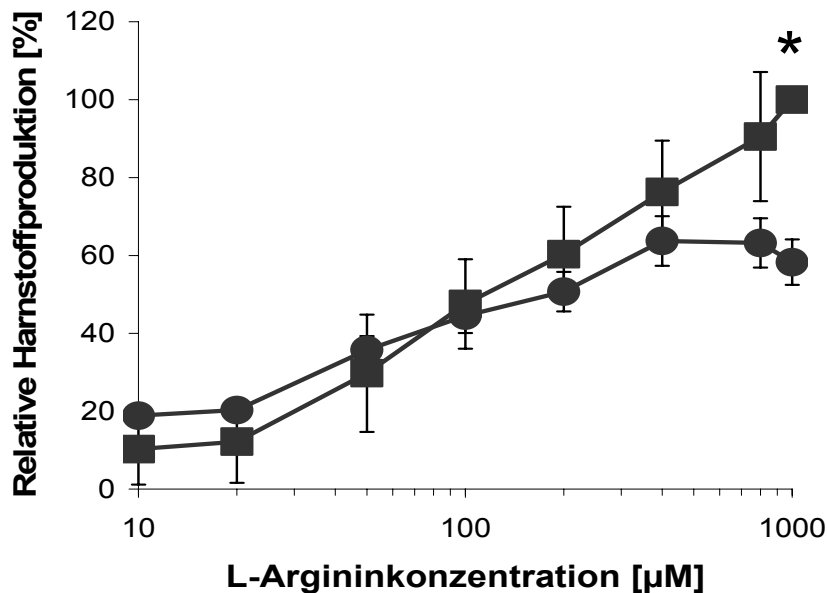
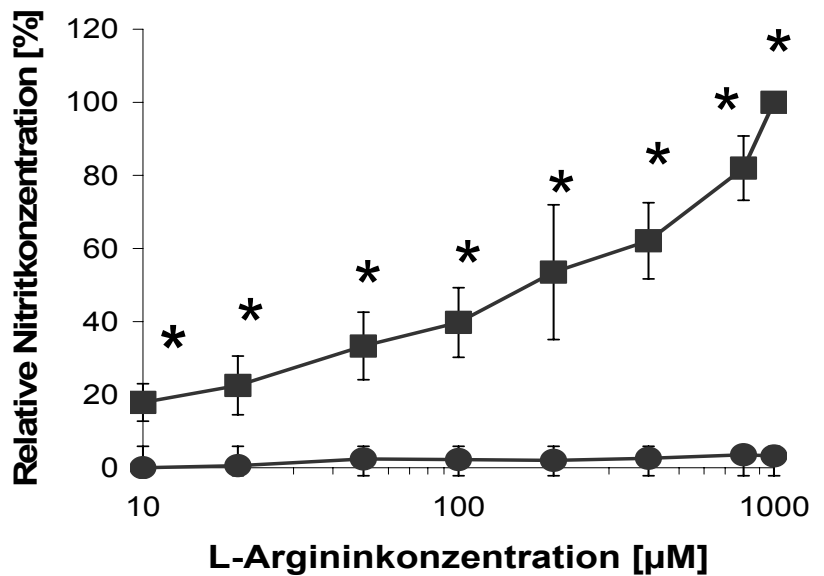


Abbildung 20: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-NIO (●).

Hepatozyten wurden, wie in Abbildung 15 beschrieben, behandelt, aktiviert und mit L-NIO [5mM] supplementiert. Für die höchste L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen (■) (=100%) wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen. Eine 100%ige Harnstoffproduktion in aktivierten Hepatozyten entspricht $763 \pm 45 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf einen signifikanten Unterschied derselben L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen mit und ohne L-NIO). Es wurde eine signifikante Inhibition der Nitritmenge erreicht, die sich über die gesamte L-Arginin-Konzentrationsreihe erstreckt. Auswirkungen der NOS 2 Inhibitionen auf die Arginase wurden nur bei hohen L-Arginin-Konzentrationen gemessen (800, 1000 μM).

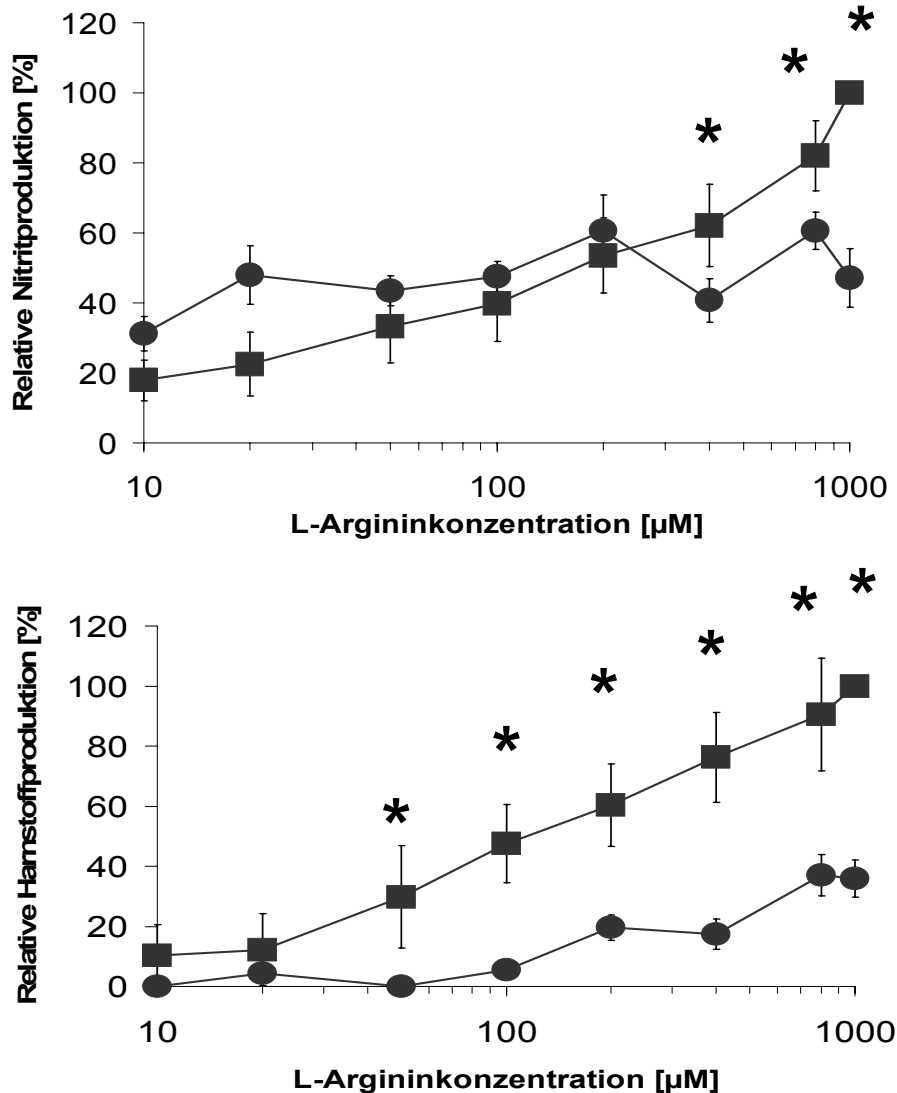


Abbildung 21: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 5mM L-NAME (●).

Hepatozyten wurden, wie in Abbildung 15 beschrieben, behandelt, aktiviert und mit L-NAME [5mM] supplementiert. Für die höchste L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen (■) (=100%) wurde eine Nitritkonzentration von $95 \pm 20 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h) gemessen. Eine 100%ige Harnstoffproduktion in aktivierten Hepatozyten entspricht $763 \pm 45 \mu\text{M}$ (pro 10^5 Zellen/24h). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt (* $p < 0,05$; bezogen auf einen signifikanten Unterschied derselben L-Arginin-Konzentration in aktivierten Zellen mit und ohne L-NAME). L-NAME hat nur bei hohen L-Arginin-Konzentrationen (800, 1000 μM) einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die NO-Produktion. Die Harnstoffproduktion wird durch L-NAME bereits ab geringen L-Arginin-Konzentrationen von 50 μM signifikant inhibiert. So wird bei einer Konzentration von 400 μM L-Arginin eine Harnstoffproduktion von $17 \pm 2\%$ erreicht (aktivierte Zellen ohne L-NAME $74 \pm 9\%$).

4. Diskussion

Es ist allgemein akzeptiert, dass Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen in der Leber spielt [62]. In diesem Zusammenhang wurden für NO sowohl protektive als auch toxische Effekte nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass beim hämorrhagischen Schock und bei Ischämie/Reperfusionsschäden NO eindeutig eine toxische Wirkung ausübt. Dabei werden diese NO-induzierten Schäden gleichzeitig mit einer erhöhten NOS 2-Aktivität in Zusammenhang gebracht, welche sowohl für Gewebeschäden als auch für eine Förderung der Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht wird [62]. Im Gegensatz dazu wurde im Tiermodell des LPS- induzierten Leberversagens eine zytoprotektive Wirkung für NO durch seine antioxidativen und antiapoptotischen Eigenschaften beschrieben [62]. In diesem Modell führte beispielsweise die Zugabe des unspezifischen NOS-Inhibitors L-NAME zu einer Verstärkung des induzierten Leberschaden [62]; wohingegen ein NO-generierendes Pharmakon (NO-Donor) einen schützenden Einfluss auf den pathologischen Zustand ausübte [60, 61]. Somit wäre im Fall einer protektiven Funktion eine Steigerung der NO-Produktion wünschenswert. Diese protektive Rolle von NO ist jedoch in diesem Lebermodell nicht unumstritten. So konnte im selben Tiermodell von einer anderen Gruppe gezeigt werden, dass eine spezifische NOS 2-Inhibition zu einer Verringerung eines Leberschadens führte [79], wodurch in diesem Fall eine Verminderung der NO-Menge anzustreben wäre.

Bezogen auf den NO-Stoffwechsel weisen Hepatozyten im Gegensatz zu anderen Zelltypen charakteristische Unterschiede auf. Zu der wichtigsten Besonderheit zählt ein funktionsfähiger Harnstoffzyklus, durch den dauerhaft L-Arginin in einem Fließgleichgewicht in größeren Mengen generiert und wiederum, durch die lebertypische und dort konstitutiv exprimierte Arginase 1, konsumiert wird [40,41]. Dadurch kann das Substrat für die hepatozytäre NOS 2 neben der exogenen Verfügbarkeit auch intrinsisch gebildet werden. Dies hat zur Folge, dass in unmittelbarer Nähe zur zytosolischen NOS 2 das enzymespezifische Substrat L-Arginin dauerhaft durch den Harnstoffzyklus geliefert werden kann. Es ist zwar auch in anderen Zellen ohne funktionsfähigen Harnstoffzyklus gezeigt worden, dass aus L-Citrullin, dem Produkt der NOS 2, wieder L-Arginin resynthetisiert werden kann,

jedoch ist dieser Effekt nicht mit den L-Arginin-Mengen vergleichbar, wie sie im Harnstoffzyklus generiert werden [80]. Bislang ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die hepatozytäre NOS 2 überhaupt in der Lage ist, dass durch den Harnstoffzyklus produzierte L-Arginin zu konsumieren. Hingegen ist ein solcher Verbrauch für das aus L-Citrullin gebildete L-Arginin bekannt [80].

Eine weitere Besonderheit in Hepatozyten sind leberspezifische kationische Aminosäuretransportsysteme (y^+), wie beispielsweise der CAT 2B. Darüber hinaus werden noch weitere bislang jedoch wenig charakterisierte kationische Transportsysteme postuliert, die L-Arginin in die Zelle transportieren können [42, 81, 82]. Aufgrund der räumlichen Nähe der NOS 2 zu der Arginase 1 im Zytosol beschäftigen sich mehrere Forschergruppen mit der Untersuchung einer möglichen Konkurrenz der beiden L-Arginin verbrauchenden Enzyme und deren Auswirkungen auf ihre Aktivität [41, 83].

Eine mögliche Konkurrenz um das Substrat von NOS 2 und Arginase 1 wurde bisher an murinen Makrophagen [41], humanen Keratinozyten [29] und Endothelzellen der Ratte [84, 85] untersucht. Dabei zeigte Morris et al. an Makrophagen, dass eine Inhibition der Arginase 1 zu einer Erhöhung der NOS 2-Aktivität führt [41]. Ähnliches konnte für Keratinozyten, jedoch nicht für Endothelzellen gezeigt werden [29, 84]. Aufgrund der besonderen Bedeutung des NO-Stoffwechsels für die Pathophysiologie der Leber und der besonderen enzymatischen Ausstattung der Hepatozyten (Harnstoffzyklus, konstitutiv exprimierte Arginase 1) ist es von großer Bedeutung zu klären, inwiefern eine oben genannte Konkurrenz zwischen den Enzymsystemen besteht und ob die NOS 2 Zugriff auf den intrinsischen L-Arginin-Pool hat. Daraus ergeben sich folgende drei Aspekte: 1). Kann in Hepatozyten, die über eine intrinsische L-Arginin-Produktion durch den Harnstoffzyklus verfügen, überhaupt eine Konkurrenz um das Substrat entstehen? 2). Kann die Arginase 1 die NOS 2 durch einen Substratentzug beeinflussen? 3). Welche Rolle haben exogene L-Arginin-Konzentrationen beim möglichen Zusammenspiel von NOS 2 und Arginase 1?

Es ist bekannt, dass sich die L-Arginin-Konzentration auf die NOS 2-Aktivität in einer paradoxen Weise auswirkt: Aufgrund der niedrigen K_m -Werte der NOS 2 für ihr Substrat L-Arginin würde man erwarten, dass bei physiologischen L-Arginin-Konzentrationen von 80-200 μ M die NOS 2 maximal aktiv wäre [50]. Dies konnte für Hepatozyten nicht bestätigt werden. Vielmehr beobachtet man, dass auch bei

supraphysiologischen L-Arginin-Konzentrationen, die Zugabe von weiterem L-Arginin zu einer weiteren Zunahme der NOS 2-Aktivität führt. Für dieses „L-Arginin Paradoxon“ gibt es bislang nur die von Morris et al. beschriebene Theorie der intrazellulären L-Arginin-Kompartimentierung [41, 48]. Diese besagt, dass der L-Arginin-Pool in der Zelle auf unterschiedliche Einzel-Kompartimente verteilt ist und dass die L-Arginin-verbrauchenden Enzymsysteme wie NOS 2 und Arginase 1 nur beschränkt auf diese einzelnen Kompartimente zugreifen können [41, 48].

Um die Hypothese der Kompartimentierung in Hepatozyten zu prüfen, wurde zunächst eine humane Hepatozyten-Zelllinie (HepG2) untersucht. Über diese Zellen ist bekannt, dass sie nach Zytokinaktivierung die NOS 2 exprimieren und dass sie über CATs und die Arginase 1 verfügen [86]. Leider erwiesen sich im Rahmen dieser Untersuchungen Zytokin-aktivierte HepG2-Zellen als ungeeignet für die Beantwortung unserer Fragestellung. Dies lag einerseits an einer Voraktivierung der Zellen, in denen bereits im residenten Zustand ein NOS 2-mRNA Signal vorhanden war, andererseits an einer fehlenden NOS 2-Aktivität im Sinne der NO-Produktion, die mit Hilfe der Griess-Reaktion im Kulturüberstand nicht nachzuweisen war. Letztlich konnte mit Hilfe eines allgemein verwendeten anti-humanen NOS 2-Antikörpers zwar eine NOS 2-charakteristische Proteinbande detektiert werden; allerdings wurde dabei auch eine Vielzahl uncharakteristischer Banden nachgewiesen, so dass die Spezifität des Protein-Nachweises angezweifelt werden könnte. Die Schwierigkeit mittels der Western-Blot-Technik humanes NOS 2-Protein nachzuweisen, ist in der wissenschaftlichen Fachliteratur bekannt. Es gibt nur wenige Antikörper, die das humane Protein der NOS 2 nachweisen können [87]. Die Tatsache, dass HepG2-Zellen trotz NOS 2-mRNA und NOS 2-Protein keine signifikante NO-Menge produzieren, stellt für humane Zellen keine Besonderheit dar. So konnte bisher keine primäre Zelle humanen Ursprungs mit einer hohen NO-Synthese gefunden werden, auch wenn diese ausgeprägte Signale einer NOS 2-mRNA und Protein-Expression aufweisen. Eine erhöhte NOS 2-abhängige NO-Produktion konnte auch nur in wenigen humanen Zelllinien gezeigt werden, wie z.B. der Darmepithelzelllinie, DLD, oder den aus der Leber stammenden AKN-Zellen [75, 88]. Die Befunde einer fehlenden NOS-2 Aktivität ‚in vitro‘ widersprechen den ‚in vivo‘ beobachteten hohen Nitrit-Mengen bei inflammatorischen Zuständen wie der Sepsis [89]. Begründet wird diese Diskrepanz mit einer hoch-komplexen Regulation des

humanen NOS 2-Gen-Promotors in humanen Zellen [89]. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der HepG2 erwiesen sich diese Zellen für die angestrebten Untersuchungen als ungeeignet, so dass wir eine weitere Zelllinie humanen Ursprungs, die AKN-Zellen untersuchten [75]. In diesen Zellen konnte nach Zytokin-Stimulation eine signifikante Nitrit-Produktion nachgewiesen werden. Allerdings exprimieren diese Zellen keine Arginase 1-mRNA. Daher wird vermutet, dass der Harnstoffzyklus in diesen Zellen unvollständig ist.

AKN-Zellen werden in der Literatur als ‚Leber-ähnliche‘ Zellen epithelialen Ursprungs charakterisiert [75]. Die eindeutige Herkunft der Zellen bleibt jedoch zweifelhaft. Wahrscheinlich stammen AKN-Zellen von Gallengangsepithel ab und sind somit keine hepatozytäre Zellen. Aus diesem Grund eigneten sich auch humane AKN-Zellen nicht für weitere Untersuchungen zur Interaktion der NOS 2 und Arginase 1.

Um die oben gestellte Frage nach der Kompetition von NOS 2 und Arginase 1 dennoch beantworten zu können, wurde auf das bereits beschriebene Entzündungsmodell in Hepatozyten der Ratte zurückgegriffen. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie spezifische kationische Aminosäuretransporter [90], eine konstitutive Arginase 1-Aktivität [91] und nach Zytokin-Aktivierung eine entsprechende NOS 2-Aktivität aufweisen [86].

Eine unerwartete Schwierigkeit ergab sich dadurch, dass die Hepatozyten, welche durch eine Leberperfusion gewonnen wurden, während des Isolationsprozesses stark voraktiviert wurden. Dabei wiesen die Zellen eine NOS 2-Enzymaktivität und eine Nitrit-Akkumulation im Kulturüberstand auf. Eine besondere Rolle bei dieser Voraktivierung von Hepatozyten wird der Kollagenaselösung zugeschrieben [78]. Es wird diskutiert, dass es durch enzymatische Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten als Folge des Verdauungsprozess von Oberflächenstrukturen zu einer direkten NOS 2-Aktivierung kommen kann [78]. Andererseits könnte im Rahmen der Isolierung auch eine Verunreinigung der Kollagenaselösung mit LPS und die Anwesenheit von einzelnen Nukleinsäurebestandteilen über ‚toll-like-receptors‘ (TLR) zu einer NF- κ B abhängigen Aktivierung der NOS 2 führen [92]. Daher war es zwingend notwendig die Zellen vor Versuchsbeginn über 48h ruhen zu lassen. Durch diese Wartezeit konnte gewährleistet werden, dass die Hepatozyten vor ihrem Einsatz im Versuch wieder einen residenten Status erreichten.

Die meisten in der Literatur beschriebenen Studien werden mit Zellkulturmedien durchgeführt, in denen supraphysiologische Konzentrationen von bis zu 1,2 mM L-Arginin vorliegen. Um den Einfluss von subphysiologischen, physiologischen und supraphysiologischen L-Arginin-Konzentrationen zu untersuchen, wurde L-Arginin-freies Medium verwandt und die gewünschte Konzentration durch Substitution mit L-Arginin erreicht. Bezüglich der Abhängigkeit der NOS 2- und Arginase 1-Aktivität von der Substratkonzentration zeigte sich im Intervall von 10-1000 μ M in Zytokin-aktivierten Zellen ein nahezu linearer Aktivitätsanstieg mit steigender L-Arginin-Konzentration. Diese Konzentrationsabhängigkeit der NOS 2 in Hepatozyten verhält sich anders als beispielsweise in aktivierten Endothelzellen der Ratte [84], murinen Makrophagen [48] oder humanen Keratinozyten [93]. Dort kann man eine maximale NOS 2-Aktivität in Bereichen von 100-300 μ M L-Arginin im Medium nachweisen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der Harnstoffzyklus oder dessen Metabolite für den linearen Verlauf der NOS 2-Aktivität in Hepatozyten verantwortlich sein können? Andererseits könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass Produkte des Harnstoffzyklus bei physiologischen oder supraphysiologischen Konzentrationen die NOS 2-Aktivität inhibieren. Zu diesem Thema finden sich in der Literatur zwei Studien, die die Bedeutung von exogenen L-Arginin-Konzentrationen und der Aktivität des Harnstoffzyklus in perfundierten Rattenlebern für die NOS 2 Aktivität beschreiben [94, 95]. Während die Arbeit von Wettstein et al. [94] einen Anstieg der NOS-abhängigen Nitrit/Nitratproduktion nach Zugabe von Ammoniak findet, zeigt sich bei der zweiten Studie -trotz nahezu identischer Versuchsbedingungen- dieser Effekt gerade nicht [95]. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Studien ist die Art und Weise der Perfusion, die im einen Fall die Perfusionslösung rezirkulieren lässt [95] und im anderen Fall keine Rekontamination ermöglicht [94]. Da die Rezirkulation der Perfusionslösung z.B. Aminosäuren von Leberzellen enthalten kann, besteht hier die Einflussmöglichkeit auf die Aktivitäten der NOS 2 und des Harnstoffzyklus. Da die Leber aus unterschiedlichen Zelltypen besteht, von denen die Hepatozyten zwar in der Anzahl weit überwiegen, könnte der beschriebene Effekt auf die NOS 2-Aktivität aber auch durch Kupfferzellen, Endothelzellen und Itozellen einen gewissen Beitrag zur Antwort des Organs leisten [96].

In einer parallel durchgeführten Arbeit wurde ebenfalls der Rolle des Harnstoffzyklus und dessen Metaboliten in humanen Keratinozyten nachgegangen [97]. Dabei wurde nachgewiesen, dass auch unphysiologische Harnstoffkonzentrationen keinen

Einfluss auf die NOS 2-Aktivität haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben ebenso keinen Anhalt für einen Einfluss der Harnstoff-Konzentration auf die NOS 2-Aktivität, da sowohl die NOS 2- als auch die Arginase-Aktivität bei zunehmender L-Arginin-Konzentration linear ansteigen. Darüber hinaus führt eine starke Stickstoff-Belastung des hepatozytären Stoffwechsels durch Zugabe hoher Aminosäure-Konzentrationen wie z.B. L-Valin oder L-Lysin zu einer Erhöhung, und keinesfalls zu einer Erniedrigung der NOS 2-Aktivität. Somit ist die hier beobachtete lineare Zunahme der NOS 2-Aktivität mit zunehmender Substratkonzentration nicht das Resultat einer Harnstoff-abhängigen Unterdrückung der NOS 2-Aktivität.

Die in Hepatozyten beschriebene lineare Zunahme der NOS 2- und Arginase-Aktivität bei steigender exogener L-Arginin-Konzentration kann nicht durch den bekannten K_m -Wert für NO-Synthasen von 2-20 μM erklärt werden, da unter diesem Gesichtspunkt gerade bei supraphysiologischen L-Arginin-Konzentrationen keine Linearität mehr gegeben wäre [50, 98]. Zudem muss bedacht werden, dass die exogene L-Arginin-Konzentration nicht zwangsläufig die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration reflektieren muss. Der L-Arginin-Transport ist ein aktiver Prozess, der von kationischen Aminosäuretransportsystemen abhängt, so dass ein extrazelluläres L-Arginin-Angebot keine Aussagen über die intrazelluläre Konzentration zulässt. Man geht davon aus, dass das kationische Aminosäuretransportersystem (γ^+ , CAT 2B) hauptsächlich für die Arginasen der Hepatozyten zur Verfügung steht [81, 82, 90]. Wird dieses System, wie hier demonstriert, durch die Zugabe von L-Lysin kompetitiv gehemmt, kommt es zwar zu einer Inhibition der Arginasen, jedoch ist die NOS 2-Aktivität nahezu unbeeinflusst und verhält sich gegenüber der externen L-Arginin-Konzentration wie in aktivierten Zellen ohne Zugabe von L-Lysin. Da unter diesen Bedingungen die Transporter des Arginase-Substrates, aber nicht die Arginase selbst inhibiert sind, muss die dennoch aktive NOS 2 durch einen anderen Transportweg als CAT 2B mit dem exogenen L-Arginin versorgt werden. In diesem Zusammenhang muss spekuliert werden, dass andere kationische Aminosäuretransportsysteme als γ^+ an der Versorgung der hepatozytären NOS 2 mit L-Arginin beteiligt sind [81].

Eine andere Überlegung, die das hier gezeigte Phänomen erklären könnte, liegt in der von Morris et al. beschriebenen Hypothese einer intrazellulären L-Arginin

Kompartimentierung, die nur bestimmte intrazelluläre L-Arginin-Quellen für die NOS 2 vorsieht [41, 99, 100]. Unter Berücksichtigung dieser Hypothese haben wir die Effekte einer Arginase-Inhibition auf die NOS 2-Aktivität in Hepatozyten untersucht. Dabei wurde der inhibitorische Effekt von L-Valin auf die Arginasen genutzt, der bereits von Saheki et al. beschrieben wurde [101]. Durch die Zugabe von L-Valin konnte die Aktivität der Arginase vollständig inhibiert werden. Eine derartige Inhibition der hepatozytären Arginasen hatte bis zu einer L-Arginin-Konzentration von 400µM keine Auswirkungen auf die NOS 2-Aktivität. Bei supraphysiologischen L-Arginin-Konzentrationen ab 400µM konnte jedoch eine signifikante Steigerung der NOS 2-Aktivität von bis zu 30% nachgewiesen werden. Diese Auswirkung der Arginase-Inhibition konnte auch von Schnorr et al. in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden [97], jedoch interessanterweise nicht in Endothelzellen der Ratte [84].

Die Effekte lassen vermuten, dass durch die Inhibition der Arginasen die intrazelluläre Substratverfügbarkeit für die NOS 2 erhöht ist. Dieser Effekt tritt jedoch nicht, wie möglicherweise erwartet, bei physiologischen Konzentrationen, sondern erst bei supraphysiologischen L-Arginin-Konzentrationen auf. Dadurch unterstützen die gezeigten Ergebnisse die von Morris et al. diskutierte Hypothese einer intrazellulären L-Arginin Kompartimentierung, da nur unter bestimmten Bedingungen wie z.B. einer hohen L-Arginin-Konzentration im Medium und einer gleichzeitigen Inhibition der L-Arginin-konsumierenden Arginase, weitere Substratquellen für die NOS 2 freigegeben werden [48]. Durch eine Inhibition des Substratverbrauchs der Arginasen verbleibt somit mehr Substrat für die NOS, welches in Form einer gesteigerten NOS 2-Aktivität erkennbar ist.

Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob dieser Effekt auf die Inhibition der Arginase 1 oder der Arginase 2 zurückzuführen ist. Die mitochondrial lokalisierte Arginase 2 hat keine direkte Verbindung zur NOS 2, wohingegen die zytosolische Arginase 1 in direkter Nachbarschaft zur NOS 2 steht. Durch die Inhibition der Arginasen lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die Erhöhung der NOS 2-Aktivität durch einen verminderten Konsum des extrazellulären L-Arginins zu erklären ist oder auf eine erhöhte intrinsische L-Arginin-Verfügbarkeit zurückzuführen ist. Diese Frage könnte man beantworten, wenn es gelänge sowohl die Arginase als auch den für die Arginasen spezifischen Substrattransport zu inhibieren.

Es ist bekannt, dass kationische Aminosäuretransporter nicht für L-Arginin spezifisch sind sondern auch L-Lysin und L-Ornithin in die Zelle transportieren [42, 49, 90]. Die Zugabe von L-Ornithin zu aktivierten Hepatozyten steuert dabei drei Mechanismen: 1) Es inhibiert ebenso wie L-Lysin kompetitiv die kationischen Aminosäuretransporter; 2) infolge einer Produkthemmung inhibiert es die Arginase und 3) es kann zusätzlich den Harnstoffzyklus mit Substrat versorgen.

Überraschenderweise konnten wir beobachten, dass nach Zugabe von L-Ornithin die NOS 2-Aktivität ihre L-Arginin-Konzentrationsabhängigkeit vollkommen verloren hat. Bereits bei den niedrigsten exogenen L-Arginin-Konzentrationen (10 μ M) wies die NO-Produktion zwischen 90-120% der maximalen NOS 2-Aktivität auf und stieg bei der höchsten L-Arginin-Konzentration unter Zugabe von L-Lysin und L-Ornithin bis auf 180% an.

Die höchste L-Arginin-Syntheserate findet im Harnstoffzyklus der Leber statt, der in den periportalen Hepatozyten lokalisiert ist [102]. Die Netto-L-Arginin-Synthese wird nur dann ermöglicht, wenn der Harnstoffzyklus in hinreichender Menge mit den notwendigen Ausgangsprodukten z.B. L-Ornithin ausgestattet wird. Die Ergebnisse der mit L-Ornithin supplementierten Hepatozyten verdeutlichen, dass der Harnstoffzyklus in der Leber unter Inhibition der Arginase hinreichend L-Arginin für die NO Produktion der NOS 2 bereitstellen kann. Dabei verursacht die Zugabe von L-Ornithin eine Produkt-medierte Inhibition der Arginase und konkurriert um den L-Arginin-Transport. Gleichzeitig füttert L-Ornithin den Harnstoffzyklus, um L-Arginin zu produzieren. Das durch den Harnstoffzyklus generierte L-Arginin ist somit frei für die NOS 2-Aktivität verfügbar und macht die NOS 2 damit völlig unabhängig von extrazellulärem L-Arginin und dessen Transport in die Zelle.

Darüber hinaus zeigt dieser Zusammenhang, dass die NOS 2 in Hepatozyten auch bei hohen und unphysiologischen Konzentrationen von L-Arginin nicht vollständig aktiviert ist. Allerdings werden diese suprphysiologischen Konzentrationen ‚in vivo‘ faktisch nie erreicht.

Die Zugabe von L-Ornithin spricht jedoch gegen eine strenge L-Arginin-Kompartimentierung, die unter diesen Bedingungen bedeutungslos erscheint. Sobald der Substratfluss im Harnstoffzyklus gehemmt ist, der intrazelluläre Substratkonsum durch die Arginasen verhindert ist, aber der Harnstoffzyklus selbst noch voll aktiv ist, könnte das dort entstehende L-Arginin der NOS 2 zu Verfügung stehen. Dadurch ist

bewiesen, dass auch in Abwesenheit von exogenem L-Arginin die NOS 2-Aktivität allein durch das intrinsische L-Arginin angetrieben wird.

Dabei sind zwei Szenarien möglich: Unter der Annahme, dass eine erhöhte intrazelluläre L-Arginin-Konzentration den Harnstoffzyklus beschleunigt und somit zu einer Anreicherung von L-Arginin führt, kann dieses L-Arginin als Substrat der NOS 2 genutzt werden und in einer Erhöhung der NOS 2-Aktivität resultieren. Es gibt jedoch auch Berichte, die zeigen, dass L-Ornithin den Harnstoffzyklus hemmen bzw. arretieren kann [102]. Unter dieser Annahme und der zusätzlichen Hemmung der Arginasen durch L-Ornithin würde das im ‚steady state‘-gebildete L-Arginin wiederum der NOS 2 als Substrat zur Verfügung stehen. Ein solcher L-Ornithin-induzierter Effekt würde jedoch schnell zu einer Depletierung des vorhandenen L-Arginin-Spiegels führen und in der Folge zu einer Abnahme der NOS 2-Aktivität. Daher wird es in weiteren Experimenten notwendig sein die NOS 2-steigernde Wirkung von L-Ornithin zu überprüfen und den zu Grunde liegenden Mechanismus nachzuweisen.

Aus den Experimenten mit L-Ornithin ist zudem ersichtlich, dass die in Hepatozyten bei extrazellulären, supraphysiologischen L-Arginin-Konzentrationen beobachtete scheinbar maximale NOS 2-Aktivität durch intrazellulär gebildetes L-Arginin noch zusätzlich gesteigert werden kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ab einer bestimmten Substratkonzentration im Medium der CAT-abhängige L-Arginin-Influx ein Maximum erreicht und auch durch Erhöhung der extrazellulären L-Arginin-Konzentration nicht mehr weiter gesteigert werden kann, obwohl der Substratumsatz des maximal aktiven NOS 2-Enzyms durchaus noch steigerbar zu sein scheint.

Bei den mannigfachen Versuchen, durch pharmakologische Interventionen insbesondere die Aktivität der NOS 2 zu beeinflussen, hat man bereits sehr früh versucht, durch den Einsatz verschiedenster Substratderivate mehr oder minder spezifisch die NOS 2 kompetitiv zu hemmen. Die hier präsentierten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass insbesondere in Hepatozyten die in anderen Zelltypen beobachteten Wirkungen der gängigsten L-Arginin-Analoga nicht die bekannten Wirkungen zeigen. So beobachten wir in dieser Arbeit, dass der unspezifische NOS-Inhibitor L-NAME auch in hohen Konzentrationen, die hepatozytäre NOS 2 nur mäßig hemmt, jedoch zu einer starken Inhibition der Arginase-Aktivität führte. Im Gegensatz dazu fanden wir unter Verwendung des NOS 2-Inhibitors L-NIO eine nahezu komplette NOS 2-Inhibition, jedoch ohne einen

signifikanten Einfluss auf die Arginasen. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Befunden von Robertson et al [104], der mit L-NAME ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Arginasen beobachtete. Somit können NOS-Inhibitoren je nach Spezifität zu einer effektiven Verringerung der NO-Produktion beitragen und damit die pathophysiologische Toxizität von NO vermindern. Diese Ergebnisse deuten jedoch noch auf einen weiteren wichtigen Aspekt hin, nämlich auf die Rolle der L-Arginin-Transporter und ihre Hemmbarkeit durch die genannten NOS-Inhibitoren. Da, wie an anderer Stelle bereits erwähnt, eine kompetitive Hemmung des γ^+ -Transportsystems in erster Linie zur Hemmung der Arginase, aber nicht zur Hemmung der NOS 2-Aktivität führt, haben wir die Möglichkeit diskutiert, dass Hepatozyten über unterschiedliche Substrat-Transportsysteme für die beiden L-Arginin-verbrauchenden Enzyme verfügen, und dass die verschiedenen Substratpools auch differentiell genutzt werden. Diese Spekulation wird durch die eben genannten Befunde zusätzlich gestützt. Es ist bekannt, dass L-NAME hauptsächlich über die CATs ins Zytoplasma transportiert wird. Als L-Arginin-Analogon könnte L-NAME somit natürlich auch kompetitiv den CAT-gesteuerten L-Arginin-Influx sowie auch die Arginase-Aktivität hemmen. Unter der Annahme, dass das durch CATs-transportierte Substrat der NOS 2 nicht zur Verfügung steht, konnte es, wie hier beobachtet, keinen starken inhibitorischen Einfluss auf die NOS 2 ausüben. Die Tatsache, dass L-NIO, ein L-Ornithinderivat, über einen NOS 2-bdienenden Transportweg in die Zelle gelangt, würde, ebenfalls wie hier gezeigt, primär die NOS 2-Aktivität, jedoch nicht die Arginase-Aktivität tangieren. Für das Verständnis und zum Beweis der hier durchdachten Hypothesen sind jedoch weitere zukünftige Untersuchungen unerlässlich.

Insgesamt konnten mit dieser Arbeit in aktivierten Hepatozyten drei unbekannte Mechanismen der Interaktion von NOS 2 und Arginase 1 beobachtet werden:

- 1.) In Hepatozyten verdichten sich Hinweise darauf, dass die kationischen Aminosäure-Transporter nicht zwangsläufig beide L-Arginin-konsumierenden Enzyme mit Substrat versorgen, da eine kompetitive Hemmung der CATs in dieser Arbeit zwar zu einer Inhibition der Arginase jedoch nicht zu einer Hemmung der NOS 2 führte. Da neben dem CAT-System in der Leber noch weitere L-Arginin-Transportsysteme vermutet werden, könnten diese eine spezifische Funktion in der NOS 2-spezifischen Substratversorgung erfüllen.

2.) Eine Inhibition der Arginasen führt zu einer nur sehr schwachen Erhöhung der NOS 2-Aktivität, die ansonsten im Wesentlichen von der extrazellulären L-Arginin-Konzentration abhängig ist. Unter Annahme einer L-Arginin-Kompartimentierung bedient sich die NOS 2 in einem solchen Fall nicht des intrinsisch-produzierten L-Arginins, sondern greift auf das von außen transportierte und durch die Arginasen nicht konsumierte L-Arginin zurück.

3.) Eine kompetitive Hemmung der CATs und der Arginasen bei einer gleichzeitigen „Überladung“ des Harnstoffzyklus durch Zugabe von L-Ornithin führt zu einer supramaximalen NOS 2-Aktivität, die völlig unabhängig von der extrazellulären L-Arginin-Konzentration ist. Dieser Effekt ist spezifisch in Hepatozyten, da analoge Experimente mit Endothelzellen oder Keratinozyten zu vollkommen anderen Ergebnissen führen [84, 97].

Für ein tiefergehendes Verständnis dieser Effekte sind weitere Untersuchungen notwendig, um in der Leber organspezifisch schützende Funktionen von NO zu fördern und schädigende Funktionen abzumildern.

5. Literaturverzeichnis

1. Furchgott RF, Zawadzki JV, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-376.
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem J.* 2000; 357(Pt 3):593-615.
3. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E, *Nitric oxide production and signaling in inflammation*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4(4):471-479.
4. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM, *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500(1-3):255-266.
5. de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM Jr, Billiar TR, Geller DA, *Transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (NOS 2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS 2 promotor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 1054-1059.
6. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V, *Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities*. *J Biol Chem* 1995; 376: 327-343.
7. Suschek C, Fehsel K, Kroncke KD, Sommer A, Kolb-Bachofen V, *Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophage-like nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration*. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 685-695.
8. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ, *Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 9730-9734.
9. Suschek C, Rothe H, Fehsel K, Enczmann J, Kolb-Bachofen V., *Induction of macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells: IL-1 β -mediated induction regulated by TNF-alpha and IFN-gamma*. *J. Immunol.* 1993; 151: 3283-3291.
10. Nussler AK, Billiar TR, *Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase*. *J. Leukoc. Biol.* 1993; 54: 171-178.

- 11.. Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR, *Role of nitric oxide in liver injury*. *Curr Mol Med* 2003; 3(6): 519-526.
12. Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Forstermann U, *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B*. *Mol. Pharmacol.*1996; 49: 15-21.
13. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C, *Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta*. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 605-614.
14. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C, *Mechanisms of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin 4 in primary mouse macrophages*. *J.Leucocyte Biol.* 1994; 55: 227-233.
15. Li H, Poulos TL, *Structure-function studies on nitric oxide synthases*. *J Inorg Biochem.* 2005; 99(1):293-305.
16. Parratt JR, *Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia*. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41 Suppl A:31-39.
17. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, et al., *Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1*. *Nature*, 1994. 368(6473): 703-710.
18. Li Y, Severn A, Rogers MV, Palmer RM, Moncada S, Liew FY, *Catalase inhibits nitric oxide synthesis and the killing of Leishmania major in murine macrophages*. *Eur J Pharmacol.*1992; 22: 441-446.
19. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T, *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. *Nature* 1988; 332: 411-414.
20. Babu BR and Griffith OW, *N5-(1-imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase*. *J Biol Chem* 1998; 273: 8882-8889.
21. Schulman IH, Zhou MS, Raj L, *Nitric oxide, angiotensin II, and reactive oxygen species in hypertension and atherogenesis*. *Curr Hypertens Rep.* 2005; 7(1):61-67.
22. Naseem KM, *The role of nitric oxide in cardiovascular diseases*. *Mol Aspects Med* 2005; 26(1-2):33-65.

23. Kubes P, Suzuki M, Granger DN, *Nitric Oxide: An endogenous modulator of leucocyte adhesion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 4651-4655.
24. Sicher SC, Vasquez MA, Lu CY, *Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide*. J Immunol 1994; 153: 1293-1300.
25. Kolb-Bachofen V, Kröncke KD, Fehsel K, Suschek CV, *Role of inducible nitric oxide synthase in autoimmune or other immune-mediated diseases.*, in *Nitric Oxide*, L. Ignarro, Editor. 2000, Academic Press: New York. p. 811-821.
26. Bishop A, Anderson JE, *NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological*. Toxicology 2005;208(2):193-205.
27. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ, *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain*. Prog Neurobiol 2005;76(2):126-52.
28. Schmidt HHHW, Walter U, *NO at work*. Cell 1994; 78: 919-925.
29. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek CV, Beck KV, Pfeilschifter J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, *Arginase-1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation*, Am J Pathol 2003;162: 1, 203-211.
30. Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J, *Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness*, Trends Pharmacol Sci 2003;24: 9, 450-455.
31. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhardt D, Morris Jr SM, Kuypers FA, *Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease*, J Pediatr Hematol Oncol 2003; 25: 8, 629-634.
32. Anggard E, *Nitric oxide: mediator, murderer, medicine*. The Lancet 1994; 343: 1199-1206.
33. Gross SS, Wolin MS, *Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanisms*. Ann. Rev. Physiol 1995; 57: 737-769.
34. Spahl DU, Berendji-Grun D, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, Kroncke KD, *Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn²⁺ release*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):13952-13957.
35. Lala PK, Chakraborty C, *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression*. Lancet Oncol. 2001;2(3):149-156.

36. Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V, *Nitric oxide induced apoptosis in mouse thymocytes*. J Immunol 1995;155: 2858-2865.
37. Zhang J, Dawson TM, Snyder SH, *Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity*. Science 1994; 263: 687-689.
38. Suschek CV, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V, *Nitric oxide fully protects against UVA- induced apoptosis in tight correlation with bcl-2 upregulation*. J Biol Chem 1999; 274: 6130-6137.
39. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD, *Comparative properties of arginases*. Comp Biochem Physiol 1996; 114: 107-132.
40. Morris Jr. SM, *Enzymes of Arginine Metabolism*. J Nutr 2004;134: 2743S–2747S.
41. Wu G, Morris Jr. SM, *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Biochem J 1998; 336 (Pt 1): 1-17.
42. Closs EI, Mann GE, *Membrane Transport of L-Arginine and Cationic Amino Acid Analogs*, in *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*, L. Ignarro, Editor. 2000, Academic Press: Los Angeles. p. 225-241.
43. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE, *The role of arginine in infection and sepsis*. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2005;29(1 Suppl):S70-74.
44. Muriel P, *Regulation of nitric oxide synthesis in the liver*. J Appl Toxicol 2000;20(3):189-195.
45. Böger RH, Bode-Böger SM, *The clinical pharmacology of L-arginine*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001; 41: 79-99.
46. Ozaki M, Gotoh T, Nagasaki A, Miyanaka K, Takeya M, Fujiyama S, Tomita K, Mori M, *Expression of arginase II and related enzymes in the rat small intestine and kidney*. J Biochem 1999; 125: 586-593.
47. Spector EB, Jenkinson CP, Grigor MR, Kern RM, Cederbaum SD, *Subcellular location and differential antibody specificity of arginase in tissue culture and whole animals*. Int J Dev Neurosci 1994; 12: 337-342.
48. Morris Jr. SM, Kepka-Lenhart D, Chen LC, *Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells*. Am J Physiol, 1998; 275(5 Pt 1): E740-747.

49. Simmons WW, Closs EI, Cunningham JM, Smith TW, Kelly RA, Cytokines and insulin induced cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. Regulation of L-arginine transport and NO production by CAT- 1, CAT-2A, CAT-2B. *J Biol Chem* 1996; 271: 11694-11702.
50. Knowles RG, Moncada S, *Nitric oxide synthases in mammals*. *Biochem J* 1994; 298 (Pt 2):249-258.
51. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD, *Comparative properties of arginases*. *Comp Biochem Phys B* 1996; 114: 107-132.
52. Suschek CV, Schnorr O, Kolb-Bachofen V, *The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all?* *Curr Mol Med*. 2004;4(7):763-775.
53. Szabo C, Thiemeermann C, *Mechanism of the induction of nitric oxide synthase*. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 113-153.
54. Zamora R, Vodovotz Y, Aulak KS, Kim PK, Kane JM 3rd, Alarcon L, Stuehr DJ, Billiar TR, *A DNA microarray study of nitric oxide-induced genes in mouse hepatocytes: implications for hepatic heme oxygenase-1 expression in ischemia/reperfusion*. *Nitric Oxide* 2002; 7: 165-186.
55. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY., *Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. *Nature* 1995; 375: 408-411.
56. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, et al., *Selectins: A family of adhesion receptors*. *Cell* 1991; 67: 233.
57. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR, *Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function*. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63(7): 766-781.
58. Li J, Billiar TR, *The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes*. *Cell Death Differ* 1999; 6(10): 952-955.
59. Saavedra JE, Billiar TR, Williams DL, Kim YM, Watkins SC, Keefer LK, *Targeting nitric oxide delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor-necrosis-factor-alpha-induced apoptosis and toxicity in the liver*. *J Med Chem* 1997; 40: 1947-1954.
60. Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlig S, Tiegs G, Wendel A, *Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor-necrosis-factor-alpha-induced liver injury through distinct pathways*. *Hepatology* 1995; 22: 1829-1837.

61. Ou J, Carlos TM, Watkins SC, Saavedra JE, Keefer LK, Kim YM, Harbrecht BG, Billiar TR, *Differential effects of nonselective nitric oxide synthase and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia*. Nitric Oxide 1997; 1: 404-416.
62. Li J, Billiar TR, *Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver*. Am J Physiol 1999; 276(5 Pt 1): G1069-G1073.
63. Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR, *Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis*. Circ Res 1999; 84(3): 253-256.
64. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM, *Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 282(5): 1075-1079.
65. Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR, *Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition*. J Biol Chem 2000; 275(15): 10954-10961.
66. Diehl AM, *Cytokine regulation of liver injury and repair*. Immunol Rev 2000; 174: 160-171.
67. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, Liew FY, Zaragoza C, Lowenstein C, Diehl AM, *Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(23): 13829-13834.
68. Wiest R, Groszmann RJ, *The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough*. Hepatology 2002; 35(2): 478-491.
69. Nanji AA, Jokelainen K, Lau GK, Rahemtulla A, Tipoe GL, Polavarapu R, Lalani EN, *Arginine reverses ethanol-induced inflammatory and fibrotic changes in liver despite continued ethanol administration*. J Pharmacol Exp Ther 2001; 299(3): 832-839.
70. Hon WM, Lee KH, Khoo HE, *Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby?* Ann N Y Acad Sci 2002; 962: 275-295.
71. Bauer M, Bauer I, Sonin NV, Kresge N, Baveja R, Yokoyama Y, Harding D, Zhang JX, Clemens MG, *Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver*. Hepatology 2000; 31(4): 937-947.

72. Zhang, J.X., M. Bauer, and M.G. Clemens, *Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 1): p. G269-277.
73. Baveja R, Keller S, Yokoyama Y, Sonin N, Clemens MG, Zhang JX, *LPS-induced imbalanced expression of hepatic vascular stress genes in cirrhosis: possible mechanism of increased susceptibility to endotoxemia*. Shock 2002; 17(4): 316-321.
74. DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB, *Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease)*. Semin Liver Dis 2002; 22(1): 27-42.
75. Nussler AK, Vergani G, Gollin SM, Dorko K, Morris SM Jr, Demetris AJ, Nomoto M, Beger HG, Strom SC, *Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver*. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1999; 35(4): 190-197.
76. Schwartz AL, Fridovich SE, Knowles BB, Lodish HF, *Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line*. J Biol Chem 1981; 256(17): 8878-8881.
77. Morris KM, Aden DP, Knowles BB, Colten HR, *Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2*. J Clin Invest 1982; 70(4): 906-913.
78. Wang H, Gao X, Fukumoto S, Tademoto S, Sato K, Hirai K, *Post-isolation inducible nitric oxide synthase gene expression due to collagenase buffer perfusion and characterization of the gene regulation in primary cultured murine hepatocytes*. J Biochem (Tokyo) 1998; 124(5): 892-899.
79. Thiemermann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR, *The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase*. Br J Pharmacol 1995; 116: 2845-2851.
80. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR, *The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(21):8612-8616.
81. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y, *CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters*. Pflugers Arch 2004;447(5):532-542.

82. Closs EI, Borel Rinkes IH, Bader A, Yarmush ML, Cunningham JM, *Retroviral infection and expression of cationic amino acid transporters in rodent hepatocytes*. J Virol 1993; 67(4):2097-2102
83. Bune AJ, Shergill JK, Cammack R, Cook HT, *L-arginine depletion by arginase reduces nitric oxide production in endotoxic shock: an electron paramagnetic resonance study*. FEBS Letters 1995; 366(2-3): 127-130.
84. Suschek CV, Schnorr O, Hemmrich K, Aust O, Klotz LO, Sies H, Kolb-Bachofen V, *Critical role of L-arginine in endothelial cell survival during oxidative stress*, Circulation 2003;107(20): 2607-2614.
85. Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ, *Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production*. Am J Physiol 1996; 271(5 Pt 2):H1988-1998.
86. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR, *Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 522-526.
87. Persönliche Mitteilung der Firma Beckton Dickinson (ehemals Transduction Laboratories, Lexington, USA) 2000.
88. Kleinert H, Euchenhofer C, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Forstermann U, *Involvement of protein kinases in the induction of NO synthase II in human DLD-1 cells*. Br J Pharmacol 1998; 123(8):1716-1722.
89. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V, *Inducible nitric oxide synthase in human diseases*. Clin Exp Immunol 1998; 113(2):147-156.
90. Closs EI, *Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids*. Curr Opin Nephrol Hypertens 2002;11(1):99-107.
91. Liu J, Hatzoglou M, *Control of expression of the gene for the arginine transporter Cat-1 in rat liver cells by glucocorticoids and insulin*. Amino Acids 1998;15(4):321-337.
92. Dobrovolskaia MA, Kozlov SV, *Inflammation and cancer: when NF-kappaB amalgamates the perilous partnership*. Curr Cancer Drug Targets. 2005; 5(5):325-344

93. Schnorr O, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, *The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin*. J Invest Dermatol 2003; 120(6):1016-1022.
94. Wettstein M, Gerok W, Haussinger D, *Endotoxin-induced nitric oxide synthesis in the perfused rat liver: effects of L-arginine and ammonium chloride*. Hepatology 1994; 19(3): 641-647.
95. Pastor CM, Morris Jr SM, Billiar TR, *Sources of arginine for induced nitric oxide synthesis in the isolated perfused liver*. Am J Physiol 1995; 269(6): G861-866.
96. Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA, *Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver*. J Cell Biol 1969; 42(1): 68-91.
97. Schnorr O, *Die Bedeutung von L-Arginin-Transport und -Metabolismus für die Entzündungsregulation in der humanen Haut: Limitierung der iNOS-Aktivität durch Arginase-1 Überexpression als molekularer Mechanismus der Hyperproliferation in der Psoriasis*. Promotionsarbeit am Institut für Immunobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2003
98. Morris SM, *Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis, in Nitric Oxide Biology and Pathobiology*, in *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*, L. Ignarro, Editor 2000, Los Angeles Academic Press: Los Angeles. 187-197.
99. Mori M, Gotoh T, Nagasaki A, Takiguchi M, Sonoki T, *Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis*. J Inherit Metab Dis 1998; 21 Suppl 1: 59-71.
100. Morris Jr SM, Billiar TR, *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis*. Am J Physiol 1994; 266(6 Pt 1): E829-839.
101. Saheki T, Sato Y, Takada S, Katsunuma T, *Regulation of urea synthesis in rat liver. Inhibition of urea synthesis by L-norvaline*. J Biochem (Tokyo) 1979;86(3):745-750.
102. Vissers S, Legrain C, Wiame JM, *Control of a futile urea cycle by arginine feedback inhibition of ornithine carbamoyltransferase in Agrobacterium tumefaciens and Rhizobia*. Eur J Biochem 1986;159(3):507-11.

103. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA, *Nitrogen metabolism and ornithine cycle function*. *Physiol Rev* 1990; 70(3): 701-748.
104. Robertson CA, Green BG, Niedzwiecki L, Harrison RK, Grant SK, *Effect of nitric oxide synthase substrate analog inhibitors on rat liver arginase*. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197(2):523-8.

6. Abkürzungen

CaM	Calmodulin
cDNA	klonierte DNA
c-GMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ELISA	Electrophoretic Immunosorbent Assay
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 β , IL-4, IL-6	Interleukine 1 beta, 4 und 6
γ -IRE	Interferon- γ -responsible Elemente
kb	Kilo Baasenpaare
kDA	Kilo Dalton (Molekulargewicht)
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histokompatibility Complex
Myr	Myristolation
NF- κ B	Transkriptionsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS 1 / eNOS	endotheliale, konstitutive NO-Synthase
NOS 2 / iNOS	induzierbare NO-Synthase
NOS 3 / nNOS	neuronale NO-Synthase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
TH1 /TH2	T-Helfer-Zell-Subpopulationen
TLR	Toll-like-receptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<i>Abbildung 1: Schematische Strukturen von NOS 3 (eNOS), NOS 2 (iNOS) und NOS 3 (nNOS).</i>	7
<i>Abbildung 2: Zelluläre Interaktionen von NOS 2 produziertem NO.</i>	11
<i>Abbildung 3: Zeitkinetik von NOS 2-mRNA und Arginase 1-mRNA in HepG2-Zellen</i>	36/37
<i>Abbildung 4: Zeitkinetik von CAT 1-mRNA und CAT 2-mRNA in HepG2-Zellen</i>	38/39
<i>Abbildung 5: Zeitkinetik von Arginase 2-mRNA in HepG2-Zellen</i>	39
<i>Abbildung 6: Zeitkinetik der NOS 2- und Arginase 1 Proteinexpression in HepG2-Zellen</i>	41
<i>Abbildung 7: NOS 2 Inhibition in HepG2- Zellen</i>	43
<i>Abbildung 8: Zeitkinetik von NOS 2-mRNA in AKN-Zellen</i>	45
<i>Abbildung 9: Zeitkinetik von Arginase 1-mRNA in AKN-Zellen</i>	45
<i>Abbildung 10: Zeitkinetik der Nitritproduktion von AKN-Zellen</i>	46
<i>Abbildung 11: Zeitkinetik der Arginase 2-, CAT 1- und CAT 2-mRNA bei AKN-Zellen</i>	47/48
<i>Abbildung 12: Proteinexpression von NOS 2 und Arginase in AKN-Zellen</i>	48
<i>Abbildung 13: Charakterisierung der Rattenhepatozyten</i>	52/53
<i>Abbildung 14: NOS 2 Inhibition mit L-NIO bzw. L-NAME</i>	54

<i>Abbildung 15: Relative Nitrit- und Harnstoffproduktion in Rattenhepatozyten bei variablen L-Arginin-Konzentrationen.</i>	56/57
<i>Abbildung 16: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Valin</i>	58
<i>Abbildung 17: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Lysin</i>	60
<i>Abbildung 18: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Ornithin</i>	62
<i>Abbildung 19: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 20mM L-Lysin und L-Ornithin</i>	64
<i>Abbildung 20: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 5mM L-NIO</i>	66
<i>Abbildung 21: Nitrit und Harnstoffproduktion in aktivierten Rattenhepatozyten nach Zugabe von 5mM L-NAME</i>	67
<i>Tabelle 1: Nitritproduktion in AKN-Zellen unter Zugabe von NOS Inhibitoren</i>	51
<i>Tabelle 2: Nitrit- und Harnstoffproduktion in Rattenhepatozyten</i>	53

8. Zusammenfassung

Die Regulation der Stickstoffmonoxid (NO) Synthase durch die induzierbare NOS 2 (iNOS) spielt eine entscheidende pathophysiologische Rolle. Da sowohl die NOS 2 als auch die Arginase 1 dasselbe Substrat, L-Arginin, benötigen, wird eine gegenseitige Regulation der Enzym-aktivitäten für verschiedene Zelltypen beschrieben, in denen die Arginase 1 induzierbar ist. In Hepatozyten sind die Arginase 1 sowie die kationischen Aminosäuretransporter (γ^+ , CAT), die die L-Arginin-Aufnahme aus dem Extrazellulärraum vermitteln, konstitutiv exprimiert, und stellen einen Teil des vollständigen Harnstoffzyklus dar. Der Einfluss auf die NO-Produktion nach Zytokin-Aktivierung ist noch umstritten.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Frage an primären Rattenhepatozyten und den humanen Leberepithel-Linien HepG2- und AKN-Zellen untersucht werden, wobei sich herausstellte, dass die humanen Zelllinien ungeeignet waren, da in HepG2 keine NO-Synthese und in AKN keine Arginase 1 Expression nachweisbar war. Frisch isolierte Rattenhepatozyten wurden für 24h in Anwesenheit verschiedener L-Arginin-Konzentrationen mit und ohne Zytokinaktivierung kultiviert. Die Akkumulation von Nitrit und Harnstoff im Kulturüberstand wurde als Äquivalent der Enzym-Aktivität gemessen und die Expression der beiden Enzyme mit PCR und Western Blot überprüft. Die Versuche unter Verwendung verschiedener Inhibitoren ergaben vier wesentliche Ergebnisse: 1. Die Aktivität der NOS 2 ist überraschenderweise abhängig von der exogenen L-Arginin-Konzentration und auch bei der supraphysiologischen Konzentration von 1mM noch nicht gesättigt. Dies ist wohl Leber-spezifisch, da z.B. in Endothelzellen aus den gleichen Tieren eine solche Abhängigkeit nicht beobachtet werden konnte. Dieser Befund weist auf eine Benutzung des Harnstoffzyklus-medierten L-Arginins hin, da dort eine solche L-Arginin-Abhängigkeit bekannt ist. 2. Unter physiologischen L-Arginin-Konzentrationen wird die NOS 2 Aktivität nicht verändert durch eine Inhibition der Arginase-Aktivität. Offensichtlich reicht der L-Arginin-Import zusammen mit der gesteigerten L-Arginin-Verfügbarkeit für eine gleich bleibende NOS 2 Aktivität aus. 3. Unter physiologischen Arginin-Konzentrationen wird die NOS 2 Aktivität durch kompetitive Hemmung des L-Arginin-Importes nicht verändert, obwohl die Arginase-Aktivität signifikant abnimmt. 4. Zugabe von L-Ornithin, dem Produkt der Arginase 1, bedingt eine Produkt-medierte Hemmung der Arginase Aktivität und führt zu einer überraschenden supramaximalen Aktivität der NOS 2 und völliger Unabhängigkeit von der exogenen Arginin-Konzentration. Dieses letzte Ergebnis zeigt einerseits, dass die NOS 2 tatsächlich L-Arginin aus dem Harnstoffzyklus für die NO-Synthese verwenden kann und weist andererseits darauf hin, dass die NOS 2 Aktivität unter physiologischen Bedingungen nicht maximal ist.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen auch auf, dass Untersuchungen zum L-Arginin-Stoffwechsel aus der Zellkultur nicht ohne weiteres verwendbar sind, da alle konventionellen Medien einen extrem supraphysiologischen L-Arginin-Spiegel aufweisen, der um den Faktor 5 bis 10 über den physiologischen Konzentrationen im Extrazellulärraum liegt.

9. Lebenslauf

Name, Vorname: Lerzynski, Guido Alois

Adresse: Hermann-Löns-Weg 13, 42697 Solingen

Geburtsdatum und -ort: 10.01.1997 in Langenfeld (Rhld.)

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 08/1993-07/1987 St.Martinus-Grundschule in Richrath
08/1987-07/1996 Marienschule in Leverkusen-Opladen (04.06.1996 Abitur)

Wehr- & Zivildienst: 08/1996-08/1997 Caritas Pflegestation Monheim am Rhein & St. Lukas Kliniken Solingen

Hochschulausbildung 10/1997-12/2004 Medizin- und Public Health-Studium in Düsseldorf, Edinburgh und Nantes

Berufstätigkeit seit 01.02.2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter beim Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) Siegburg

Publikationen

Lerzynski GA, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, *In hepatocytes the regulation of NOS2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle.* Nitric Oxide 2006; im Druck.

Lerzynski GA, Allan A, Murray SA, Die Bewertung der palliativmedizinischen Patientenversorgung mit Hilfe der Palliative Care Outcome Scale (POS) in verschiedenen Versorgungsformen. Zeitschrift für Palliativmedizin 2004; 5:19-27.

Hemmrich K, Suschek CV, Lerzynski G, Schnorr O, Kolb-Bachofen V, *Specific iNOS-targeted antisense knockdown in endothelial cells.* Am J Physiol Cell Physiol 2003; 285(2):C489-98.

Hemmrich K, Suschek CV, Lerzynski G, Kolb-Bachofen V, *iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage.* J Appl Physiol 2003; 95(5):1937-46.

Lerzynski GA, Suschek CV, Schnoor O & Kolb-Bachofen V, *In activated rat hepatocytes iNOS activity largely depends on urea cycle derived L-arginine.* NO-Kongress Frankfurt 2002.

Lerzynski GA, Suschek CV, Schnoor O & Kolb-Bachofen V, *The influence of arginine supply, arginine utilisation and arginase activity on iNOS activity in hepatocytes.* NO-Kongress Magdeburg 2001 und Hannover 2001.