

Einfluss von limitierter L-Argininverfügbarkeit auf die Regulation der Genexpression

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Guido Kagemann
aus Soest

Düsseldorf

Oktober 2006

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sies

Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2006

Der Unterschied
zwischen dem richtigen Wort
und dem beinahe richtigen
ist der gleiche wie
zwischen einem Blitz und einem Glühwürmchen.

Mark Twain

Gewidmet meiner Freundin Ariane

I. ZUSAMMENFASSUNG	5
II. EINLEITUNG	7
1. Einführung in den L-Argininmetabolismus	7
2. Arginasen und NO-Synthasen	9
3. L-Argininquellen	14
3.1 Endogenes L-Arginin-Recycling.....	14
3.2 L-Arginin-Transport.....	15
3.3 L-Argininverfügbarkeit <i>in vivo</i>	15
4. Bedeutung des von der iNOS synthetisierten NO in Infektionen und Entzündungen. 16	
4.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	18
5. Regulatorische Effekte von NO und L-Arginin	19
6. Ziel und Fragestellung dieser Arbeit	21
III. MATERIAL UND METHODEN	22
1. MATERIAL	22
1.1 Zellen, Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide	22
1.1.1 Zellen.....	22
1.1.2 Bakterien	22
1.1.3 Plasmide	22
1.1.4 Oligonukleotide und PCR-Programme	22
1.2 Chemikalien, Kits, Enzyme, Zytokine und Antikörper	23
1.2.1 Chemikalien	23
1.2.2 Kits	23
1.2.3 Enzyme und Zytokine	24
1.2.4 Antikörper	24
1.3 Zellkulturmedien und Zusätze	24
1.4 Bakteriennährmedium	24
1.5 Sonstige Chemikalien	25
2. METHODEN	26
2.1 Zellkultur	26
2.1.1 Zellkulturen in Standard-Medium.....	26
2.1.2 Zellkulturen mit modifiziertem Medium.....	26
2.1.3 Zytokinaktivierung	26
2.1.4 Bestimmung der Apoptose mit Hoechst-Färbung.....	26

2.1.5 Bestimmung der Nekrose mittels Propidiumiodid-Färbung	27
2.1.6 Bestimmung der Zellzahl mittels Neutralrot	27
2.1.7 Probenvorbereitung für Analysen mit dem Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorting-FACS</i>)	27
2.2 Biochemische/immunologische Methoden	27
2.2.1 Bestimmung der NOS-Aktivität mittels Griess-Test	27
2.2.2 Verwendung von NO-Donoren	28
2.2.3 Arginaseaktivitätsbestimmung	28
2.2.4 Western Blots	28
2.2.5 Isolierung der Kernextrakte und <i>electrophoretic mobility shift assay (EMSA)</i>	29
2.2.6 Bestimmung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen	29
2.3 Molekularbiologische Techniken	29
2.3.1 Quantitative Genexpressionsanalyse	29
2.3.2 Bestimmung des <i>Mycoplasma hyorhinis</i> Titers	30
2.3.3 Sequenzierung der PCR-Fragmente und Vektoren	30
2.3.4 Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in stabil transfizierten Zellen.....	31
2.3.5 Kultivierung von Bakterien	31
2.3.6 Plasmid-DNA-Isolierung	31
2.3.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit	31
2.3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Nucleobond MAXI AX-100 EF Kit	31
2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.3.8 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	32
2.3.9 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
2.3.11 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.3.12 Extraktion von DNA-Fragmente aus dem Gel	33
2.3.13 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	33
2.3.14 RNA Isolation und reverse Transkription	33
2.4 Statistische Analysen.....	34
IV. ERGEBNISSE.....	35
1. Untersuchungen zu den regulatorischen Effekten der L-Argininverfügbarkeit auf die Expression der iNOS.....	35
1.1 Etablierung eines Zellsystems zur Simulierung limitierter L-Argininverfügbarkeit	35
1.2 Eingeschränkte L-Argininverfügbarkeit führt zu einer Induktion der iNOS mRNA-Expression	36
1.3 In aktivierten Zellen bewirkt die verminderte L-Argininverfügbarkeit eine starke Erhöhung der iNOS mRNA-Expression	37
1.4 Die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität wird durch eine verminderte L-Argininverfügbarkeit erhöht.....	39
1.5 Die iNOS Proteinexpression nimmt dosisabhängig mit der L-Argininkonzentration ab	40
1.6 Regulation der Translation durch die L-argininabhängige Phosphorylierung der Translationsinitiationsfaktor-Untereinheit eIF2 α	41
1.7 Analyse der iNOS Aktivität	42
1.8 Physiologische Mengen Stickstoffmonoxid haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von eIF2 α	43

2. Einfluss der L-Argininverfügbarkeit auf das Expressionsmuster von IL-1α.....	45
2.1 Die IL-1 α mRNA-Expression wird nicht durch die L-Argininverfügbarkeit verändert	45
2.2 Die Konzentration von biologisch aktivem IL-1 α wird in Keratinozyten nicht durch die L-Argininverfügbarkeit beeinflusst.....	46
3. Effekte der extrazellulären L-Argininkonzentration auf Zellproliferation und Zellzyklus	47
3.1 Bestimmung der Zellzahl unter verschiedenen L-Argininkonzentrationen und Vorbehandlungen	47
3.2 Bestimmung der Zellzyklusphase mit dem Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorting-FACS</i>)	48
4. Einfluss einer <i>Mycoplasma hyorhinitis</i> Infektion auf den L-Argininmetabolismus in murinen und humanen Zellen.....	49
4.1 Die <i>M. hyorhinitis</i> Infektion induziert die iNOS mRNA-Expression und verstärkt die zytokininduzierte NO-Synthese in murinen Keratinozyten	49
4.2 Eine <i>M. hyorhinitis</i> Infektion erniedrigt die Arginase-1 mRNA-Expression und Aktivität	52
4.3 Die NF- κ B-Aktivität und -DNA-Bindungsaktivität wird durch die Infektion mit <i>M. hyorhinitis</i> gesteigert	54
4.4 Differentielle Regulation der murinen und humanen iNOS.....	55
V. DISKUSSION	58
1. Eine verminderte L-Argininverfügbarkeit erhöht die NF-κB DNA-Bindungsaktivität und beeinflusst die Regulation der iNOS Expression.....	58
1.1 Die Regulation der iNOS Translation	61
2. Einfluss limitierter L-Argininverfügbarkeit auf das Expressionsmuster von IL-1α... 62	62
3. <i>In vivo</i> Beispiele für eine verminderte L-Argininverfügbarkeit	63
4. Wie werden die regulatorischen Effekte von L-Arginin vermittelt?.....	64
5. Kann L-Arginin die Proliferation und den Zellzyklus beeinflussen?.....	66
6. Effekte einer <i>M. hyorhinitis</i> Infektion auf die iNOS/Arginase-Balance	68
6.1 Modulation der Immunantwort durch <i>M. hyorhinitis</i>	69
6.2 Differentielle Regulation des humanen und des murinen <i>iNOS</i> -Gens	70
VI. AUSBLICK.....	72
VII. LITERATURVERZEICHNIS	73
VIII. ANHANG.....	84
Abkürzungen	84
Lebenslauf	86
Publikationsverzeichnis	87

Danksagung..... 89

I. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum gerade eröffneten Feld der „*argenomics*“, das die regulatorischen Eigenschaften der Aminosäure L-Arginin auf die Genexpression umfasst. Es werden sowohl translationelle als auch transkriptionelle Regulationsmechanismen aufgezeigt. Im Entzündungsgeschehen ist NF- κ B der zentrale Transkriptionsfaktor und die induzierbare NO-Synthase ein von ihm abhängiges Gen.

Es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die lokal verminderte intrazelluläre L-Argininkonzentration sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Zytokinen erhöht wird. Die Aktivierung von NF- κ B führt zu einer Modulation der Entzündungsreaktion in Richtung T_H1-Phase. In Folge dessen steigt die iNOS mRNA-Expression während einer L-Argininverarmung gegenüber physiologischen Konditionen an. Die Induktion der iNOS mRNA fällt unter inflammatorischen Bedingungen besonders stark aus. Obwohl die iNOS mRNA-Expression deutlich erhöht wird, sinkt die iNOS Proteinexpression unter L-argininverarmten Bedingungen. Die Transkription und Translation der iNOS werden invers reguliert. Die Erklärung hierfür ist, dass der L-Argininmangel zu einer Phosphorylierung der Translationsinitiationsfaktor-Untereinheit eIF2 α führt, was eine Inhibition der zellulären Translation zur Folge hat, die auch die iNOS mRNA einschließt. Zudem wird dadurch der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und die Transkription proinflammatorischer Gene initiiert.

Die regulatorischen Eigenschaften der Aminosäure L-Arginin waren auf transkriptioneller Ebene bislang kaum erforscht. Bisher konnten ähnliche Effekte nur bei der Depletion essentieller Aminosäuren oder bei der Verarmung mehrerer Aminosäuren nachgewiesen werden. Da es z.B. durch einen erhöhten L-Argininsatz der iNOS selbst oder der Arginasen während einer Entzündung zu einer limitierten L-Argininverfügbarkeit kommen kann, sind die regulatorischen Eigenschaften erniedrigter L-Argininkonzentrationen besonders wichtig.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Auswirkung limitierter L-Argininverfügbarkeit erweitern das Verständnis der regulatorischen Eigenschaften der bedingt essentiellen Aminosäure L-Arginin und stellen die Auswirkungen auf den Haupttranskriptionsfaktor für Gene, die im Laufe einer Entzündung eine Rolle spielen, dar.

Summary

The work presented here contributes to the recently opened research field termed argenomics, which focuses on the regulatory properties of the amino acid L-arginine and its effects on gene expression. Both translational and transcriptional regulatory mechanisms have been examined. NF- κ B is the major transcription factor in the propagation and progression of inflammation with iNOS representing one prominent NF- κ B dependent gene.

It was demonstrated that the DNA binding activity of the transcription factor NF- κ B is increased in response to locally reduced intracellular L-arginine concentrations both in the presence and in the absence of cytokines. Activation of the cells modulates inflammatory processes favouring T_H1 type responses and delaying T_H2 type responses. In consequence iNOS mRNA expression increases during L-arginine depletion compared to physiological conditions. Induction of iNOS mRNA is especially strong under inflammatory conditions. In spite of the increased iNOS mRNA expression, iNOS protein expression decreases during L-arginine depletion. Transcription and translation of iNOS are inversely regulated, because L-arginine depletion causes phosphorylation of the translation initiation factor subunit eIF2 α , resulting in inhibition of cellular translation, including iNOS mRNA. In addition the transcription factor NF- κ B is activated and the transcription of proinflammatory genes initiated. Until now research regarding the regulatory properties of the amino acid L-arginine has not been thorough on the transcriptional level. Similar effects to those mentioned in this thesis have so far been reported only during depletion of essential amino acids or starvation of a combination of amino acids. Since an increased L-arginine turnover by iNOS or the arginases can result in a limited L-arginine availability, elucidating the regulatory effects of decreased L-arginine concentrations is of special importance.

The results reported in this thesis contribute to broaden the understanding of the regulatory properties of the conditionally essential amino acid L-arginine and highlight the effects of the major transcription factor NF- κ B for genes involved in inflammatory processes.

II. Einleitung

1. Einführung in den L-Argininmetabolismus

L-Arginin, eine semiessentielle oder bedingt essentielle Aminosäure für Menschen, dient als wichtiger Teil der Proteinsynthese sowie als Vorläufer für die Synthese von Stickstoffmonoxid, Harnstoff und Kreatin. In den letzten Jahren ist das Interesse an L-Arginin stark gewachsen, was sich an der deutlich steigenden Anzahl von Publikationen ablesen lässt. Besonders die limitierte L-Argininverfügbarkeit unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ist in den Fokus der Forschung geraten. Nachdem vor einigen Jahren der Begriff „*nutrigenomics*“ eingeführt wurde, hat kürzlich Sidney Morris jr. vorgeschlagen, den Begriff „*argenomics*“ einzuführen [1]. Unter diesem Sammelbegriff werden alle L-argininabhängigen Regulationseffekte auf die Expressionsmuster von Genen und Proteinen zusammengefasst. Die Grundlagen hierfür legte schon in den 1960ern Robert Schimke, indem er zeigte, dass in vielen Zellen die Aktivität der Argininosuccinatsynthetase (ASS) und der Argininosuccinatlyase (ASL) durch L-Arginin reprimiert wird, wohingegen die Aktivität ansteigt, wenn L-Arginin durch L-Citrullin ersetzt wird [2,3].

L-Arginin spielt im Zellmetabolismus eine sehr wichtige Rolle, da es ein Vorläufer für sechs biologisch wichtige Verbindungen in Säugern (Abb. 1.1) und damit eine der metabolisch vielseitigsten Aminosäuren ist. Für diese Arbeit war es von besonderer Relevanz, dass L-Arginin eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese sowie als Vorläufer für Polyamine, für Harnstoff und für Stickstoffmonoxid spielt. L-Arginin kann aus drei verschiedenen Quellen gewonnen werden: Ernährung, endogener Synthese und Proteinabbau. Diese Vielseitigkeit der Aminosäure bereitet auf der einen Seite der Forschung ein weites Feld, auf der anderen Seite ist es dadurch schwierig, alle Aspekte in einem guten *in vivo* Schema des L-Argininmetabolismus zu vereinen.

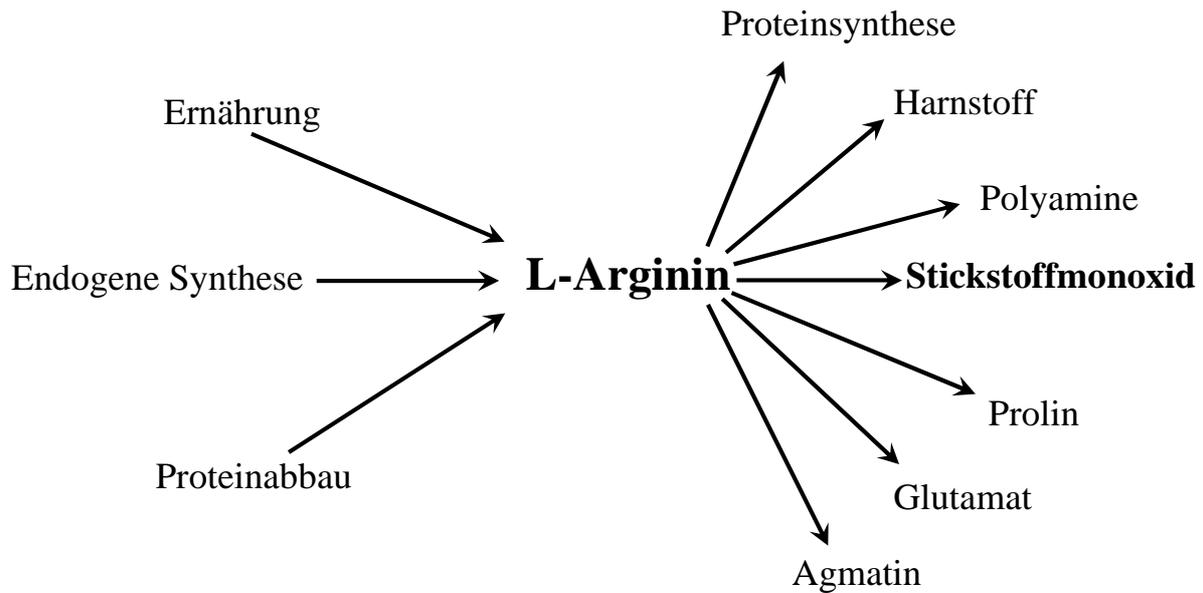


Abb. 1.1: Quellen und Stoffwechselprodukte des L-Arginins

Der Begriff Polyamine fasst hier Putrescin, Spermin und Spermidin zusammen (nach SM Morris Jr.).

Abbildung 1.2 enthält eine sehr stark vereinfachte Darstellung des L-Argininmetabolismus. Das intrazellulär vorhandene freie L-Arginin kann entweder in den NO-Citrullin-Zyklus eingeschleust oder von der Arginase metabolisiert werden. Wird das L-Arginin über die NO-Synthasen verstoffwechselt, kann das Produkt L-Citrullin über ASS und ASL wieder zu L-Arginin metabolisiert werden. NO ist auf der anderen Seite ein Stoffwechselendprodukt, das frei diffundieren und weiterreagieren kann. Setzt die Arginase das L-Arginin um, ist es für den NO-Citrullin-Zyklus verloren. Harnstoff ist ein Endprodukt, das ausgeschleust wird, während L-Ornithin zu Polyaminen oder anderen Produkten wie Glutamat und Prolin decarboxyliert wird. So konkurrieren beide Enzymgruppen um L-Arginin als ihr Substrat, wenn beide Proteine in den Zellen exprimiert werden.

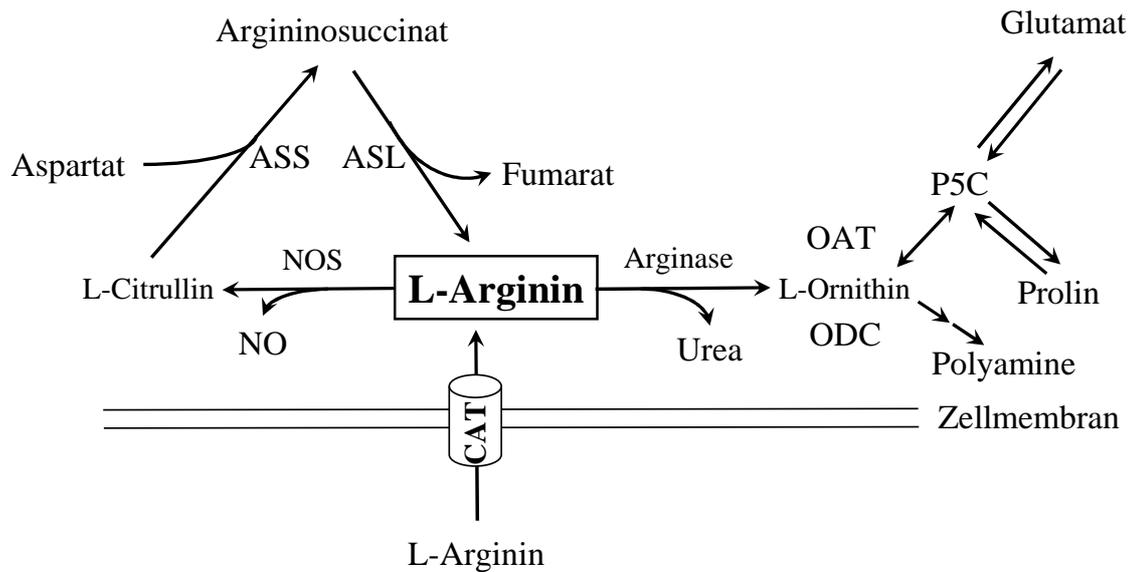


Abb. 1.2: Der L-Argininmetabolismus

Der NO-Citrullin-Zyklus setzt sich zusammen aus NO-Synthase (NOS), Argininosuccinatsynthetase (ASS) und Argininosuccinatyase (ASL). CAT, kationische Aminosäuretransporter; OAT, Ornithinaminotransferase; ODC, Ornithindecaboxylase; P5C, Pyrrolin-5-Carboxylase (nach Mori und Gotoh).

Zu dem komplexen Gebiet des L-Argininmetabolismus sind in letzter Zeit neue Aspekte hinzugekommen, so dass die früher eher NO-zentrische Sicht teilweise durch eine erweiterte, die Bedeutung des L-Arginins einbeziehende Sichtweise ersetzt worden ist.

2. Arginasen und NO-Synthasen

Der Großteil des L-Arginins wird im Organismus unter physiologischen Bedingungen auf den folgenden zwei Wegen metabolisiert: Während die Enzymgruppe der Arginasen die Hydrolyse dieser Aminosäure zu L-Ornithin und Harnstoff katalysiert, setzt die Gruppe der NO-Synthasen L-Arginin in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu NO und L-Citrullin um.

Arginasen

Die Arginase ist ein 105 kD großes Homotrimer, das Mangan für die Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff benötigt. Das Produkt L-Ornithin spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Wundheilung, weil L-Ornithin das Substrat für die Polyaminsynthese ist [4]. Es existieren zwei Isoformen der Arginase [5], die von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden und sowohl in verschiedenen Geweben als auch in

verschiedenen subzellulären Lokalisationen auftreten. Die Isoformen weisen eine hohe Homologie von 59% der Aminosäuresequenz auf [6].

Die induzierbare Arginase-1 wird konstitutiv im Zytosol von Hepatozyten exprimiert, weshalb sie auch Leber-Typ Arginase genannt wird. Hier katalysiert sie den finalen Schritt des Harnstoffzyklus und ist verantwortlich für die Produktion von etwa 10 kg Harnstoff pro Jahr bei einem durchschnittlichen Erwachsenen [7]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Arginase-1 in vielen Geweben und Zelltypen wie z.B. Keratinozyten konstitutiv exprimiert wird oder induzierbar ist. Sie wird z.B. in der Wundheilungsphase (T_H2 -Phase), wenn die frühe immunologische T_H1 -Antwort abklingt, durch Zytokine der T_H2 -Phase (Interleukin-4, Interleukin-10, Tumorgrowthfactor- β) induziert.

Die zweite Isoform Arginase-2 wird dagegen in nahezu allen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert und ist mitochondrial lokalisiert [8,9]. Sie tritt hauptsächlich in der Niere auf und hat keine Funktion im Harnstoffzyklus. Genetische „*knockout*“ Experimente deuten darauf hin, dass die Arginase-2 vielmehr eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der L-Arginin-Homöostase spielt und die L-Argininkonzentrationen für zelluläre biosynthetische Reaktionen wie die NO-Synthese reguliert [10].

NO-Synthasen

NO-Synthasen sind Homodimere von 266 kD, die durch oxidative Abspaltung des Radikal NO aus der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin synthetisieren, wobei zeitgleich äquimolare Mengen an L-Citrullin entstehen. Alle drei bisher bekannten Isoformen benötigen vier Kofaktoren, Tetrahydrobiopterin (BH_4), Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadeninukleotid (FAD) sowie Protophyrin IX Häm, um den korrekten Ablauf dieser Reaktion, bei der insgesamt fünf Elektronen übertragen werden, sicherzustellen. Während Häm und BH_4 an die N-terminalen Oxygenasedomänen der beiden Enzymuntereinheiten gebunden sind, enthalten die C-terminalen Reduktasedomänen die Bindungsstellen für Calmodulin, welches seinerseits für die Calciumbindung verantwortlich ist. Die beiden Untereinheiten der aktiven NOS sind an der Calmodulinbindungsstelle über ein Zink-Atom miteinander verbunden. Zusätzlich binden die verbleibenden Kofaktoren FAD, FMN und NADPH an die jeweiligen Reduktasedomänen [11].

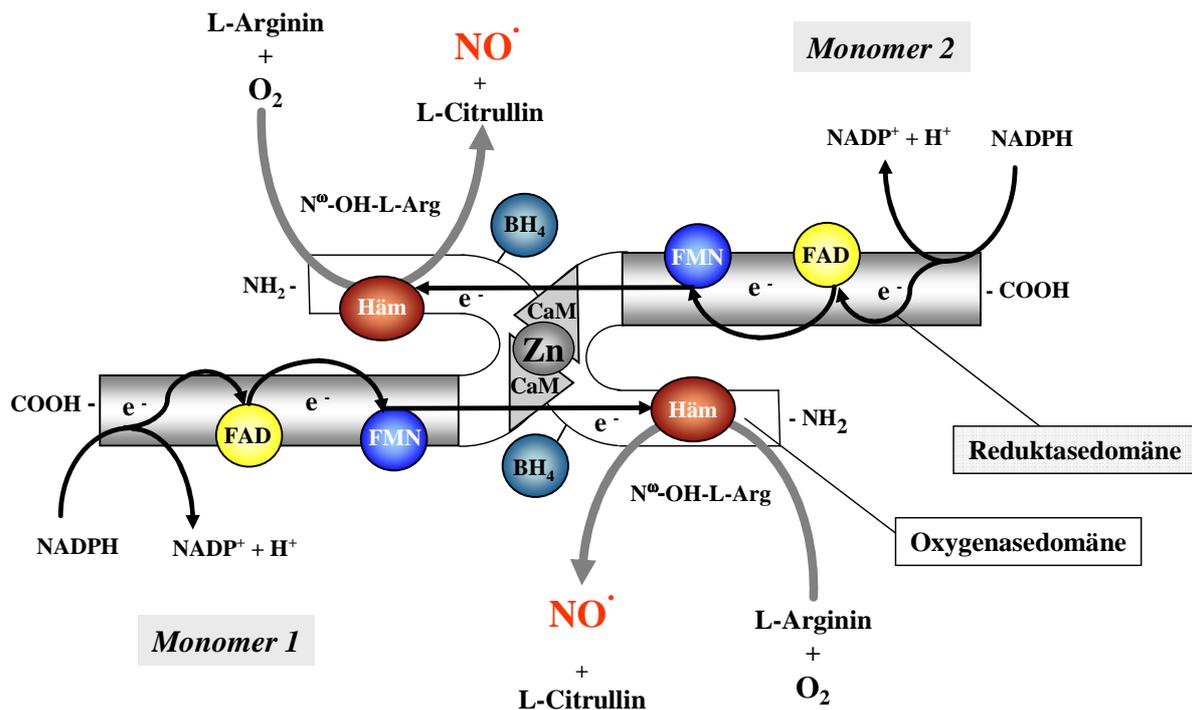


Abb. 1.3 Schematische Struktur der iNOS und ihrer Kofaktoren

Der Elektronenfluss im dimeren iNOS Protein erfolgt ausgehend vom NADPH über FAD und FMN in der Reduktasedomäne zur Hämgruppe der Oxygenasedomäne des zweiten Monomers. Die Kofaktoren erfüllen unterschiedliche Funktionen während des Reaktionsgeschehens. NADPH fungiert als Elektronendonator, FAD und FMN als Akzeptoren, wobei durch diese beiden Kofaktoren die Übertragung der Elektronen eines zwei-Elektronendonators (NADPH) auf einen ein-Elektronenakzeptor (Häm) ermöglicht wird. Tetrahydrobiopterin erfüllt mehrere Funktionen innerhalb dieser Reaktion, wobei die Stabilisierung des Dimers und die Vermeidung der Produktion von Superoxidanionen durch die Kopplung der Oxidation des NADPH und die Übertragung der Elektronen auf den Guanidinium-Stickstoff des L-Arginins essentielle Aufgaben darstellen. Das Endprodukt (NO) der Oxidation des Guanidinium-Stickstoff des L-Arginins in Gegenwart von molekularem Sauerstoff enthält das Stickstoffatom der Aminosäure und das Sauerstoffatom des molekularen Sauerstoffs (modifizierte Abbildung nach O. Schnorr).

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit kann die Aktivität aller drei Enzymisofomen mit Substratanaloga wie verschiedenen N^{ω} -L-Arginin Derivaten sowie auch Kohlenmonoxid (CO), welches irreversibel an den Häm-Kofaktor bindet, inhibiert werden, wobei jedoch die Spezifität der Substanzen von der jeweiligen Isoform und der Art ihrer Expression abhängt [11].

Unterschiede zwischen den drei NOS-Isoformen existieren in erster Linie bezüglich ihrer zellulären Lokalisation und ihrer Expressionsmuster. Die konstitutive Expression zweier NOS-Formen, der endothelialen NOS (eNOS) und der neuronalen NOS (nNOS), wurde zunächst in humanen Endothelzellen [12] bzw. in Neuronen, später jedoch in weiteren Geweben und Zelltypen, u.a. epidermalen Keratinozyten [13,14], nachgewiesen. Sowohl eNOS als auch nNOS sind für die Umsetzung von L-Arginin auf die Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an ihre Reduktasedomänen angewiesen und reagieren somit empfindlich auf Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration [15]; im Falle ihrer

Aktivierung kommt es zur pulsatilen Synthese von NO in picomolaren Konzentrationen, welches durch seine Bindung u.a. die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktiviert und damit eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration des Botenmoleküls cGMP bewirkt [16]. Das von den konstitutiven NOS-Isoformen bereitgestellte NO spielt damit eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus [17] sowie der neuronalen Signaltransduktion [18,19].

Der dritten NOS-Isoform, der induzierbaren NOS (iNOS), kommt eine besondere Bedeutung, speziell mit Blick auf die pathophysiologischen Konditionen und die Substratkompetition mit den Arginasen, zu. Im Unterschied zu den konstitutiv exprimierten Isoformen kann die iNOS nach entsprechender Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) oder proinflammatorischen Zytokinen [20] unabhängig vom intrazellulären Calciumspiegel über einen Zeitraum von einigen Stunden bis zu Tagen bei entsprechender L-Argininverfügbarkeit mikromolare NO-Konzentrationen generieren, da das Calmodulin in ihrem Fall konstitutiv an das Enzym gebunden ist; deshalb kommt es auf enzymatischer Ebene somit zu keiner kofaktorabhängigen Regulation [21]. Murine und humane iNOS unterscheiden sich insofern, als dass zur Induktion der murinen Enzymform LPS oder ein proinflammatorisches Zytokin allein ausreichend sind, während die humane Form für ihre Induktion eine Kombination aus mindestens zwei der genannten Stimuli benötigt [22,23]. So liegt der entscheidende Unterschied zwischen der murinen und der humanen Isoform darin, dass für die Induktion der murinen Isoform die Aktivierung eines Signalweges ausreicht, während für die Induktion der humanen iNOS wenigstens zwei unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden müssen. Die derartige Induktion der Expression einer murinen NOS-Isoform wurde erstmals in murinen Makrophagen beschrieben, welche durch LPS aktiviert worden waren [22], wurde aber seitdem nach Konfrontation mit inflammatorischen Stimuli in einer Vielzahl anderer Zellen beschrieben.

Das bei der Metabolisierung von L-Arginin durch die verschiedenen NOS-Isoformen freiwerdende Radikal NO mediiert in biologischen Systemen variierende und teils adverse Effekte, die sowohl zytoprotektiv als auch destruktiv ausfallen können [24-27]. Es handelt sich bei NO zwar um ein Radikal, doch besitzt es keine Ladung und ist lipophil. Diese Tatsache in Verbindung mit seiner vergleichsweise hohen Halbwertszeit ermöglichen die Diffusion über längere Strecken durch Zellen und deren Membranen hindurch [15]. Gleichzeitig sind sie der Grund für seine bevorzugte Interaktion mit ungepaarten Elektronen, wie sie häufig bei metallhaltigen Verbindungen wie den prosthetischen Gruppen von Enzymen vorliegen. Weitere Targets für NO sind andere freie Radikale, Häm- und Thiolgruppen sowie molekularer Sauerstoff [15,18,28], bei deren Reaktion mit NO u.a. Nitrit,

Nitrat, Nitrosothiole und Nitrotyrosine sowie Peroxynitrit entstehen. Die Produkte derartiger Reaktion werden als „reaktive Stickstoffspezies“ (RNOS) bezeichnet. Besonders die hohen von der iNOS generierten NO-Konzentrationen spielen unter pathophysiologischen Bedingungen eine herausragende Rolle im Rahmen der unspezifischen Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Pilzen und Parasiten [29]. Ihre Bedeutung geht jedoch über die zytotoxischen Effekte im Rahmen der unspezifischen Abwehr hinaus [30,31]. Die komplexe Chemie der Reaktion von NO bzw. RNOS mit Sauerstoff spielt zudem eine zentrale Rolle in der redoxregulierten Aktivierung zellulärer Prozesse wie Transkription, Proliferation und Apoptose [31,32].

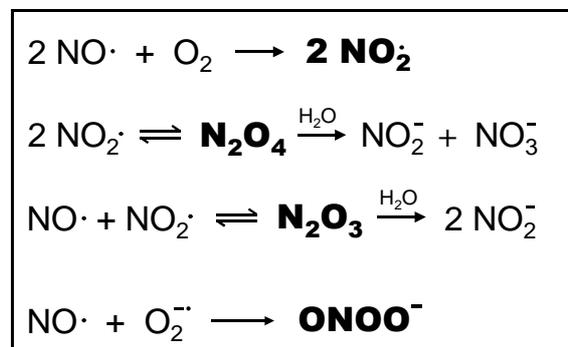


Abb. 1.4 Reaktionsprodukte von NO mit molekularem Sauerstoff

Die verschiedenen chemischen Reaktionen hängen primär von der lokalen NO-Konzentration ab. Stabile Oxidationsprodukte sind Nitrit und Nitrat. Instabile und hochreaktive Intermediate sind in dieser Abbildung fett gedruckt.

Die beschriebenen Eigenschaften von Arginase- und NOS-Isoformen machen deutlich, wie die beiden Enzymgruppen einander wechselseitig beeinflussen. Da L-Arginin das Substrat sowohl für die Arginasen als auch die NO-Synthasen darstellt, kann die Aktivität der Arginase durch die Depletion des für die NO-Biosynthese zur Verfügung stehenden L-Argininpools effektiv die NO-Synthese und damit NO-abhängige Prozesse beeinflussen. Dies wurde z.B. während der Wundheilung, der zellulären Immunantwort und bei der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur beobachtet [33-37]. Umgekehrt führt die Inhibition der Arginase zu einer starken Erhöhung der NO-Biosynthese und Verschiebung zu Gunsten NO-abhängiger Prozesse, weil die L-Argininverfügbarkeit für die NO-Synthasen gesteigert wird [38-41].

Ein zusätzlicher wichtiger Aspekt der L-Argininverfügbarkeit ist, dass es möglich ist, durch extrazelluläre Gabe von L-Arginin eine Erhöhung der iNOS Aktivität zu erreichen, obwohl die intrazelluläre L-Argininkonzentration im Bereich einiger hundert mikromolar für eine volle iNOS Aktivität ($K_M \sim 5 \mu\text{M}$) mehr als ausreichend L-Arginin zur Verfügung stehen sollte [42]. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Arginin-Paradox“. Bislang schien dieses

aus biochemischer Sicht nicht erklärbar zu sein, da die K_M -Werte für die Arginase alle im millimolaren Bereich lagen. Sie waren damit so hoch, dass die Arginase unter physiologischen Bedingungen in Bezug auf die L-Argininverfügbarkeit innerhalb der Zelle keine Rolle spielen konnte. Das Arginin-Paradox war jedoch nur dadurch zu erklären, dass die Arginase die Verfügbarkeit von L-Arginin für die iNOS einschränkt.

Aktuelle Analysen der Arginaseaktivität ergaben K_M -Werte im Bereich von 20-80 μM L-Arginin für die Arginase [43]. Damit liegt der K_M -Wert der Arginase im bzw. unter dem physiologischen Bereich, was bedeutet, dass sie in direkter Konkurrenz zur iNOS um das Substrat L-Arginin steht. Dieser Gesichtspunkt hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, da in immer mehr Entzündungsszenarien, gerade auch unter chronischen Bedingungen, eine Überexpression der Arginase beschrieben wird, die zu einer verminderten L-Argininverfügbarkeit führt, z.B. durch einen erniedrigten L-Argininplasmaspiegel.

3. L-Argininquellen

3.1 Endogenes L-Arginin-Recycling

Die Quellen freien L-Arginins im Körper sind die Nahrung, die endogene Synthese und der Abbau von Proteinen (Abb. 1.1). Ungefähr 40% des mit der Nahrung aufgenommenen L-Arginins wird im Darm katabolisiert, bevor es in den Kreislauf gelangen kann [4]. Bei einer L-Argininmangelernährung werden ca. 85% des L-Arginins, das in den Kreislauf gelangt, aus dem Abbau von Proteinen gewonnen, der Rest resultiert aus der *de novo* Synthese. Auf den gesamten Körper gesehen, stammt der Großteil des *de novo* synthetisierten L-Arginins aus der metabolischen Zusammenarbeit des Dünndarms und der Niere, deren Zusammenwirken auch als intestinal-renale Achse bezeichnet wird [4]. Der Ertrag an auf diese Weise endogen generiertem L-Arginin ist so groß, dass diese Menge für einen gesunden Erwachsenen ausreicht. Dagegen kann die endogene L-Argininsynthese nicht die Bedürfnisse eines Kindes im Wachstum oder eines Menschen, der unter einer Stoffwechselerkrankung des Dünndarms oder der Niere leidet, erfüllen. Deswegen wird L-Arginin als semiessentielle oder bedingt essentielle Aminosäure eingestuft [44].

Unter inflammatorischen Bedingungen wird zusätzlich der NO-Citrullin-Zyklus aktiviert. Das als Nebenprodukt der iNOS neben dem NO entstehende L-Citrullin wird schrittweise über die Argininosuccinatsynthetase (ASS) und die Argininosuccinatlyase (ASL) wieder zu L-Arginin

metabolisiert [45,46]. Zusätzlich ist die Proteinexpression von ASS und ASL erhöht [47], wenn die iNOS induziert wird, um die erhöhten Mengen an L-Citrullin verarbeiten zu können und wieder L-Arginin zu gewinnen. Da während einer Entzündung die Arginase induziert wird, reicht die zusätzliche L-Argininingewinnung über den NO-Citrullin-Zyklus jedoch häufig nicht aus, um beide Enzyme mit ausreichend Substrat zu versorgen. Durch den verstärkten L-Argininsatz wird die L-Argininverfügbarkeit limitiert.

3.2 L-Arginin-Transport

Neben dem Proteinabbau ist der Import von L-Arginin über die Aminosäuretransporter für kationische Aminosäuren (CATs) essentiell, um den intrazellulären Bedarf zu decken. Im humanen System konnten bisher vier Isoformen der CAT-Familie kloniert und teilweise charakterisiert werden. Die CAT-Proteine sind integrale Membranproteine mit 14 Transmembrandomänen und intrazellulären N- und C-Termini. Während der Transport kationischer Aminosäuren weitgehend Na⁺-unabhängig erfolgt, da die Transporter als Antiporter funktionieren, unterscheiden sich die zelluläre Expression und die Transportkapazitäten der einzelnen Isoformen weit reichend [48]. CAT-1 ist ubiquitär in allen Zellen und Geweben exprimiert, CAT-2 dagegen kommt in zwei Spleißvarianten CAT-2A und CAT-2B vor, die sich nur in 42 Aminosäuren unterscheiden [49]. CAT-2A wird in residenten Hepatozyten exprimiert und wird daher als „Leber-Typ“ bezeichnet, ist aber in einer Reihe weiterer Zellen und Gewebe induzierbar. Dasselbe gilt für CAT-2B, welcher resident nur in glatten Muskelzellen vorkommt. Die CAT-2-Expression wird durch LPS und T_H1-Zytokine in Makrophagen induziert [50]. Dementsprechend wird CAT-2 mit der iNOS koinduziert, da der L-Argininimport über CAT-1 allein insuffizient ist. Beide Gene, CAT-2 und iNOS, werden durch proinflammatorische Zytokine über den Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert [51].

Die Isoformen CAT-3 und CAT-4 werden beide im Gehirn exprimiert. CAT-3 scheint vor allem eine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung zu besitzen, während über die Bedeutung im adulten Organismus und über die Induktion wenig bekannt ist [52]. Eine nähere Charakterisierung von CAT-4 förderte bisher keine speziellen Eigenschaften dieses Transporters zu Tage, so dass seine genaue Funktion unklar bleibt [53].

3.3 L-Argininverfügbarkeit *in vivo*

Die physiologischen L-Argininkonzentrationen im Plasma des Menschen liegen zwischen 20 und 200 μM [54]. In Geweben ist die L-Argininkonzentration in der Niere mit 15 nmol L-

Arginin/mg Protein am höchsten, während in der Leber und im Herz nur 1 bzw. 3 nmol L-Arginin/mg Protein gefunden werden [55]. Zellkulturmedien beinhalten in der Regel L-Argininkonzentrationen von 0,4 bis 1,2 mM, die deutlich über den physiologischen Konzentrationen liegen. Dies macht einen Vergleich von *in vivo* mit *in vitro* Ergebnissen sehr schwierig und muss bei derartigen Betrachtungen berücksichtigt werden.

Besonders wichtig wird dieser Unterschied zwischen der *in vivo* und der *in vitro* Situation, wenn man die pathophysiologischen Umstände unter entzündlichen Bedingungen betrachtet. Es gibt immer mehr klinische Studien, in denen die L-Argininplasmakonzentration bei gesunden Probanden und Patienten bestimmt wird. Das geschieht vor dem Hintergrund, dass der L-Argininmetabolismus viele verschiedene unter anderem regulatorische Eigenschaften und Aufgaben hat. Eine limitierte L-Argininverfügbarkeit oder verminderte Plasmakonzentration, die eine eingeschränkte NO-Verfügbarkeit nach sich ziehen kann, wurde bei vielen Krankheiten oder pathophysiologischen Zuständen festgestellt, z.B. bei Asthma [56], Psoriasis, gestörter Wundheilung und Atemnotsyndrom [57]. Die eingeschränkte NO-Verfügbarkeit kann zu einer Hyperproliferation der Zellen oder zu verminderter Vasokonstriktion führen. Aktuelle Studien schlagen L-Arginin als Behandlung für pulmonare Hypertonie in der Sichelzellanämie [58], bei Asthma [56], bei kardiovaskulären Funktionsstörungen [59] oder in der Wundheilung und Immunantwort [60] vor. Während einer Entzündung kann das L-Arginin bedingt durch die Substratkompetition zwischen der unter diesen Umständen stark exprimierten iNOS und der Arginase begrenzt verfügbar sein [61].

4. Bedeutung des von der iNOS synthetisierten NO in Infektionen und Entzündungen

Freie Radikalspezies mit auf Sauerstoff oder Stickstoff basierenden ungepaarten Elektronen sowie andere hochreaktive metabolische Zwischenprodukte, wie das Superoxidanion O_2^- , das von der iNOS gebildete NO oder das Hypochloritanion OCl^- , spielen unter pathophysiologischen Bedingungen wie sie bei Infektionen oder Entzündungen vorliegen eine wichtige Rolle im Organismus. NO tritt in vielen Zellen und Geweben, z.B. im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder als Antwort auf einen pathogenen Stimulus, in hohen Konzentrationen auf und stellt in Kombination mit reaktiven Sauerstoffspezies eine starke Abwehr gegen einwandernde Keime und Mikroorganismen dar. Beide Radikale werden im Rahmen der ersten, akuten Immunantwort des Organismus beim Kontakt mit Pathogenen

hauptsächlich von phagozytischen Zellen wie Makrophagen und Neutrophilen produziert [62]; diese Zellen und die von ihnen freigesetzten Radikale sind ein tragender Teil der angeborenen, unspezifischen Immunität. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die chemische und biologische Reaktivität von NO stark vom Ausmaß der gleichzeitigen Synthese von Sauerstoffradikalen, besonders O_2^- , beeinflusst wird, wodurch die Bildung sekundärer reaktiver Stickstoffspezies wie Peroxynitrit ($ONOO^-$) begünstigt oder gesteigert wird [63-67]. NO zeichnet sich in diesem Zusammenhang durch seine zytotoxischen oder zytostatischen Eigenschaften aus und besitzt dadurch eine antimikrobielle Wirksamkeit zur Abwehr einer Reihe eindringender Pathogene [68-70]. Ein Beispiel für Mikroorganismen, die eine derartige schnelle und unspezifische Immunantwort auslösen können, sind Mycoplasmen. Diese sind die kleinsten freilebenden Mikroorganismen mit einem Durchmesser von ungefähr 300 nm. Sie gehören zur Klasse der *Mollicutes*, besitzen keine eigene Zellwand und wachsen zellassoziiert. Einige Spezies sind pathogen für Mensch und Tier [71,72]. Da die Gefahr einer Mycoplasmeninfektion z.B. auch in Zellkulturen generell unterschätzt wird, ist es interessant, die Auswirkungen einer solchen Kontamination auf den L-Argininmetabolismus zu untersuchen, da L-Arginin für die Synthese des im Rahmen der effektiven unspezifischen Immunantwort benötigten NO notwendig ist. Insbesondere *Mycoplasma hyorhinis* beeinflusst verschiedene zelluläre Prozesse und ist in Zellkulturen die am zweithäufigsten detektierte Mycoplasmenspezies; *M. hyorhinis* ist dort verantwortlich für 20% der Kontaminationen [73]. Weil die pathologischen Konsequenzen einer mikrobiellen Infektion durch die Interaktion des Wirtes mit dem Pathogen bestimmt werden, spielt das Verständnis dieses Mechanismus eine zentrale Rolle in der modernen Mikrobiologie, wobei es mehr darauf an kommt, die Interaktion zu verstehen als das Pathogen zu analysieren [74]. Die unmittelbare unspezifische Immunantwort ist für die Abwehr eindringender Fremdkörper und Pathogene zumeist ausreichend, erzeugt jedoch keine anhaltende Immunität. Ihre Effektivität beruht auf der Erkennung von Eigenschaften, die vielen Pathogenen gemeinsam sind. Die dafür benötigten Rezeptoren werden in der Keimbahn kodiert. Eine anhaltende Immunität dagegen kann nur im Rahmen einer adaptiven Immunantwort erworben werden, im Zuge derer pathogen- bzw. antigenspezifische Effektorzellen sowie Gedächtniszellen gebildet werden, die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine beschleunigte und wesentlich effizientere Immunantwort propagieren. Ihr zugrunde liegt ein großes Repertoire von Rezeptoren, die durch die verschiedenen Kombinationen von Genen entstehen. Sowohl im Rahmen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen vom T_H1 -Typ, die die iNOS mRNA-Expression induzieren.

4.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Immunantwort z.B. während der Wundheilung, so kann man T_H1 - und T_H2 -Phase unterscheiden, die vor allem durch ihr zeitlich versetztes Auftreten und die verschiedenen beteiligten Zytokine gekennzeichnet sind, wobei nicht zwangsweise jedes Zytokin eindeutig einer bestimmten Phase zuzuordnen ist. An der T_H1 -Phase sind unter anderem Interferon- γ , Interleukin-1 β , Interleukin-2 und der Tumornekrosefaktor- α beteiligt, während in der T_H2 -Phase Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-9, Interleukin-10 und Interleukin-13 ausgeschüttet werden.

Eine frühe Antwort (T_H1) auf eine akute Entzündung, Infektion oder während der Wundheilung beinhaltet die Induktion der induzierbaren NO-Synthase und die anschließende Metabolisierung von L-Arginin zu NO wie im Fall der Mycoplasmeninfektion. Im Verlauf der T_H1 -Phase wird zudem der zentrale Transkriptionsfaktor NF- κ B, der für die Genexpression der Gene, die größtenteils für protektive und entzündliche Proteine kodieren, aktiviert. Die NF- κ B-Familie besteht aus fünf Mitgliedern, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B-1) und p52/p100 (NF- κ B-2), die wegen ihrer Assoziation mit I- κ B (Inhibitor von NF- κ B) als inaktive Heteromere im Zytosol fast jeder residenten Zelle vorliegen [75]. Auch die I- κ B-Familie besteht aus mehreren Proteinen, I- κ B- α , - β , - ϵ , - γ und BCL-3 [76]. Die Aktivierung, d.h. in letzter Instanz die Dissoziation und Degradation des endogenen Inhibitors über das Ubiquitin/Proteasom-System und die anschließende nukleäre Translokation des NF- κ B-Dimers, erfolgt durch die Bindung von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α oder Interleukin-1, die hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet werden, an Oberflächenrezeptoren der Zellen, wodurch eine Phosphorylierungssignalkaskade ausgelöst wird. Die Ligandenbindung führt zu einer Clusterbildung der Rezeptoren und ihrer zytosolischen Schwanzenden, wodurch Adapterproteine und die I- κ B-Kinase-Kinase aktiviert werden. Im Nukleus initiiert NF- κ B die Transkription von mehr als 60 bekannten Genen, die am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. Zu diesen NF- κ B-regulierten Genen zählt auch die iNOS.

Die T_H1 -Phase geht im Verlauf der Wundheilung in die T_H2 -Phase über, während der sich das Gleichgewicht von der akuten antimikrobiellen und inflammatorischen primären Immunantwort zur Heilungs- und Regenerationsphase hin verlagert. Im Rahmen der entsprechenden Prozesse tritt z.B. die Synthese von zytotoxischen und antiproliferativen Mengen NO durch die iNOS in den Hintergrund; L-Arginin wird nun bevorzugt von der Arginase zu L-Ornithin, einem Vorläufermolekül der Polyaminsynthese, umgesetzt, so dass nun proproliferative Effekte, die z.B. die Wundheilung begünstigen, überwiegen. Mit diesem Wechsel von L-Arginin als Substrat für die zytotoxische iNOS/NO-Achse zur

Wachstumsphase der Arginase/L-Ornithin/Polyamin-Achse und damit dem Wechsel von der T_H1- zur T_H2-Phase ist die sogenannte „Reparatur“-Phase eingeleitet [77]. Der Übergang wird hauptsächlich durch Veränderungen der lokalen Zytokinzusammensetzung beeinflusst, aber auch durch die Produkte der L-Argininmetabolisierung selbst; er muss in jedem Fall streng reguliert werden [33,78,79]. Eine Induktion der Polyamine mit proliferativen Eigenschaften in der frühen Phase würde den nützlichen Eigenschaften des NO entgegenstehen. Genauso würde eine fortgesetzte NO-Synthese während der späteren „Reparatur“-Phase die wachstumsfördernden Eigenschaften der Polyamine unterdrücken. Zusätzlich würde bei einer simultanen Expression beider Enzyme L-Arginin zum limitierenden Faktor. Die Wichtigkeit der strengen Regulation und Konzertierung des Übergangs von der T_H1- zur T_H2-Phase wird am Beispiel des kutanen Wundheilungsprozesses deutlich. Als Reaktion auf exogen zugefügte Traumata wie Verletzungen, Entzündungen, Blutungen oder Infektionen ist die zügige Epithelneubildung notwendig, um die Integrität der Haut wiederherzustellen. Verläuft der Heilungsprozess unvollständig oder ist er fehlerhaft reguliert, kann das wie im Fall chronisch nicht-heilender Wunden und anderer chronischer Dysregulierungen zu schweren Beeinträchtigungen führen, die dementsprechend eine hohe klinische Relevanz aufweisen [80].

5. Regulatorische Effekte von NO und L-Arginin

NO

Die zahlreichen regulatorischen Effekte, die NO in und auf eine Zelle und deren Metabolismus ausüben kann, spiegeln die mannigfaltigen Reaktions- bzw. Aktionsmechanismen dieses vielseitigen Radikals mit verschiedensten zellulären Komponenten wider [81]. Die Abgrenzung von regulatorischen gegenüber zytotoxischen Funktionen von NO ist dabei fließend.

Die Mechanismen der NO-Wirkung umfassen dabei die kovalente Bindung des Radikals an Metallreste zellulärer Proteine sowie die reversible Nitrosierung von Thiolresten oder die Interaktion mit anderen Radikalspezies wie dem Superoxidanion O₂⁻, wobei weitere hochreaktive Spezies, z.B. Peroxynitrit, entstehen können [82]. Auch direkte Interaktionen von NO mit der DNA, die zur Deaminierung der Basen und damit zur Bildung von Mutationen führen, sind möglich [83] und mitverantwortlich für die zytotoxischen Effekte von NO. Im Fall übermäßiger DNA-Schädigung kommt es via p53-Aktivierung [84] zum

Zellzyklusarrest oder zur Aktivierung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und damit letztlich zu einem von der Zelle nicht zu tolerierenden Energieverlust [85]. Allein oder zusammen mit der möglichen Inhibition mitochondrialer Enzyme durch NO und die damit verbundene Störung der zellulären Energiegewinnung kann NO Apoptose auslösen [86].

Die kovalente Modifikation metallhaltiger prosthetischer Gruppen von Enzymen kann sowohl deren Aktivierung wie im Fall der löslichen Guanylatzyklase als auch die Inhibition der Enzymaktivität wie im Fall der Aconitase oder der Ribonukleotidreduktase nach sich ziehen [82,86,87].

Auf genregulatorischer Ebene beeinflusst NO über Nitrosylierung die Freisetzung von Zink aus Zink-Schwefel Clustern von Transkriptionsfaktoren [30,88]; die resultierende Bildung von Disulfidbrücken inhibiert daraufhin ihre DNA-Bindefähigkeit, was u.a. bereits für AP-1 (Aktivatorprotein-1) gezeigt wurde [89]. Auch die Aktivität von NF- κ B wird durch NO reguliert, jedoch auf zwei gegensätzliche Arten. Einer der Mechanismen beruht auf der Induktion und Stabilisierung der inhibitorischen Untereinheit I- κ B, was die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors verhindert, während ein erhöhter cGMP-Spiegel, wie er z.B. auch nach der Aktivierung der sGC durch Bindung von NO vorherrschen kann, aktivierend auf NF- κ B sowie AP-1 und ATF1 wirkt [90]. An dieser Stelle wird deutlich, dass NO in Abhängigkeit von seinem zeitlichen und räumlichen Auftreten und damit von der jeweils aktivierten Signalkaskade auf ein und dasselbe Targetmolekül gegensätzliche Effekte haben kann.

Generell kann NO also auf vielfache Arten in sowohl aktivierender als auch inhibierender Weise auf verschiedenste protein- und genregulatorische Prozesse des Zellmetabolismus einwirken, was sich in Abhängigkeit von den vorliegenden NO-Mengen im zellulären Kontext positiv oder negativ auswirkt.

L-Arginin

Im Gegensatz zum Kenntnisstand über Stickstoffmonoxid und seine regulatorischen Effekte ist über L-Arginin und dessen regulatorische Eigenschaften wenig bekannt. Eine aktuelle Publikation beschreibt, dass die L-Argininverfügbarkeit die Expression verschiedener Gene verändern kann [91]. Die meisten Proteine, deren Expression bei L-Argininmangel angehoben wird, sind selbst in den L-Argininmetabolismus involviert. Dazu gehören die ASS und ASL [47] sowie CAT-1 [92,93], bei denen eine verstärkte Proteinsynthese detektiert wurde [94].

Weiterhin wurde eine verminderte Proteinsynthese der zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors beschrieben [95].

Eine translationelle Kontrolle erfolgt durch die Verarmung von Aminosäuren und somit auch von L-Arginin durch die Aktivierung der GCN2 Kinase. Das führt wiederum zu einer Phosphorylierung der Translationsfaktor-Untereinheit eIF2 α , was eine Inhibierung der Translation zur Folge hat [96-98]. Obwohl erst wenige Daten zu regulatorischen Effekten von L-Arginin vorliegen, ist die Wichtigkeit von L-Arginin in diesem Zusammenhang unbestritten und „*argenomics*“ ein wachsendes Feld.

6. Ziel und Fragestellung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf dem gerade neu betretenen Feld der „*argenomics*“ Fortschritte zu machen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob eine verminderte L-Argininverfügbarkeit, wie sie bei vielen Krankheiten auftritt, Auswirkungen auf die Expressionsmuster relevanter Gene und Proteine hat. Bislang war wenig darüber bekannt, ob eine bedingt essentielle Aminosäure genregulatorische Eigenschaften besitzt. Da hauptsächlich das Geschehen unter entzündlichen Bedingungen untersucht werden sollte, lagen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen DNA-Bindungsaktivität im Fokus der Untersuchungen.

Die Effekte einer veränderten extrazellulären L-Argininverfügbarkeit auf die Expression und Aktivität NF- κ B-abhängiger Gene wie iNOS, dem kationische Aminosäuretransporter-2 und IL-1 α wurde untersucht. Diese Gene werden hauptsächlich durch NF- κ B auf transkriptioneller Ebene reguliert, doch wurden auch die regulatorischen Eigenschaften auf posttranskriptioneller Ebene untersucht. Die genannten Gene spielen eine wichtige Rolle im L-Argininmetabolismus und bei dermalen Entzündungen. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine Infektion sowohl unter entzündlichen als auch unter gesunden Bedingungen auf den L-Argininmetabolismus hat.

Die bei der Beantwortung dieser Fragen gewonnen Erkenntnisse sollen zur Charakterisierung der regulatorischen Eigenschaften von L-Arginin beitragen. Gegenstand dieser Arbeit sollte sein, wie wichtig die bedingt essentielle Aminosäure L-Arginin für den Zellmetabolismus und insbesondere für die Genregulation unter pathophysiologischen Bedingungen ist.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Zellen, Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide

1.1.1 Zellen

Tabelle: III.1 Liste der verwendeten Zellen

Name	Art	Bezugsquelle
PAM212	murine Keratinozyten	Prof. T. Schwarz, Kiel
DLD-1	humane Colonadenokarzinomzellen	DSMZ No. ACC 278, Braunschweig
A549; 16-kb Fragment des iNOS Promotors	humane Lungenkarzinomzellen, stabil transfiziert	PD Dr. H. Kleinert, Mainz

1.1.2 Bakterien

Tabelle III.2 Liste der verwendeten Bakterien

Name	relevante Eigenschaften	Bezugsquelle
Fusion Blue	<i>E. coli</i> K-12, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_{K12-} , m_{K12+})	BD Transduction
Competent Cells	<i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA98</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> F+[<i>proA+B+</i> , <i>lac^qZΔM15::Tn10(tet^R)</i>]	Biosciences, Heidelberg, Deutschland

1.1.3 Plasmide

Tabelle III.3 Liste der verwendeten Plasmide

Name	relevante Eigenschaften	Bezugsquelle
pGEM-T	<i>lacZ</i> , Amp ^r , <i>blunt end</i> Klonierungsvektor	Promega, Mannheim, Deutschland
pCMV5(CuO)- IRES-GFP	SV40 ori/promoter, Amp ^r , Puromycin ^r , Cumate induzierbarer, eukaryotischer Expressionsvektor	Q-Biogene, Heidelberg, Deutschland
pCMV5-CymR	konstitutive Expression von CymR	Q-Biogene

1.1.4 Oligonukleotide und PCR-Programme

Tabelle III.4 Liste der verwendeten Nukleotide und PCR-Programme

Produkt/GenBank accession no.		Sequenz und PCR-Protokoll	Fragment- Größe
murine GAPDH XM112389	Sense	5'-GGCAAATTCAATGGCAGAGT-3'	532 bp
	Anti-sense	5'-TGCCAGTGAGCTTCATGTTC-3'	
	Zyklusprotokoll	22 x (30 s 94°C, 45 s 60°C, 45 s 72°C) + 5 min 72°C	
humane GAPDH BC023623	Sense	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	420 bp
	Anti-sense	5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'	
	Zyklusprotokoll	20 x (30 s 94°C, 45 s 60°C, 45 s 72°C) + 5 min 72°C	

Produkt/GenBank accession no.		Sequenz und PCR-Protokoll	Fragment-Größe
murine iNOS NM010927	Sense	5'-GTGGTGACAAGCACATTTGG-3'	487 bp
	Anti-sense	5'-GGCTGGACTTTTCACTCTGC-3'	
	Zyklusprotokoll	32 x (30 s 94°C, 45 s 60°C, 45 s 72°C) + 5 min 72°C	
humane iNOS AF049656	Sense	5'-ATGCCCGATGGCACCATCAGA-3'	394 bp
	Anti-sense	5'-TCTCCAGGCCCCATCCTCCTGC-3'	
	Zyklusprotokoll	32 x (30 s 94°C, 45 s 60°C, 45 s 72°C) + 5 min 72°C	
murine Arginase-1 BC013341	Sense	5'-AAGCTGGTCTGCTGGAAAAA-3'	564 bp
	Anti-sense	5'-CCAGCAGGTAGCTGAAGGTC-3'	
	Zyklusprotokoll	32 x (30 s 94°C, 45 s 60°C, 45 s 72°C) + 5 min 72°C	
murine iNOS NM010927	Sense	5'- CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC -3'	203 bp
	Anti-sense	5'- AAGCCAAACACAGCATACC -3'	
	Zyklusprotokoll	10 min 94°C + 50 x (10 s 94°C, 10 s 60°C, 20 s 72°C)	
murine GAPDH M 32599	Sense	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	223 bp
	Anti-sense	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	
	Zyklusprotokoll	10min 94°C + 50 x (10 s 94°C, 10 s 60°C, 20 s 72°C)	
murines IL-1α NM 010554	Sense	5'-GCAACGGGAAGATTCTGAAG-3'	172 bp
	Anti-sense	5'-TGACAAACTTCTGCCTGACG-3'	
	Zyklusprotokoll	10min 94°C + 50 x (10 s 94°C, 10 s 60°C, 20 s 72°C)	
muriner CAT-2 NM 007514	Sense	5'-GTGAAGAGGTTTCGGAATCCA-3'	150 bp
	Anti-sense	5'-CGACTGGGAGTGGACTTTTC-3'	
	Zyklusprotokoll	10min 94°C + 50 x (10 s 94°C, 10 s 60°C, 20 s 72°C)	

1.2 Chemikalien, Kits, Enzyme, Zytokine und Antikörper

1.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen, falls nicht anders angegeben.

1.2.2 Kits

Tabelle III.5 Liste der Kits

Produkte	Bezugsquelle
QIAprep Spin MiniprepKit; RNeasy Midi Kit; QIAquick PCR Purification Kit; Omniscript RT Kit; <i>Taq</i> -DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoSpin Extract II	Macherey und Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond Maxi AX-100 EF	
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
LightShiftChemiluminescent <i>EMSA</i> Kit; SuperSignal West Femto/Pico Maximun Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
LightCycler FastStart DNA-Master Sybr-Green I	Roche, Mannheim, Deutschland
D _C Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
jetPEI transfection reagents	Polyplus-Tansfection, Illkirch, Frankreich

1.2.3 Enzyme und Zytokine

Tabelle III.6 Liste der Enzyme und Zytokine

Produkte	Bezugsquelle
<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>BglIII</i>	Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
T4-Ligase	Q-Biogene
Antarktische Phosphatase	NEB, Ipswich, MA, USA
humanes rekombinantes IL-1 β	Strathmann, Hannover, Deutschland
humanes rekombinantes TNF- α	Strathmann, Hannover, Deutschland
murines rekombinantes INF- γ	Strathmann, Hannover, Deutschland

1.2.4 Antikörper

Tabelle III.7 Liste der Antikörper

Produkte	Bezugsquelle
monoklonal anti iNOS (murin)	BD Transduction Biosciences
polyklonal murine Arginase-1	BD Transduction Biosciences
polyklonal eIF2 α (murin)	Cell Signaling
polyklonal Phospho eIF2 α (Ser51) (murin)	Cell Signaling
anti- α -actin antibody (human)	Sigma
sekundär rabbit-anti-mouse-IgG Antikörper	DAKO A/S, Dänemark
sekundär goat-anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.
monoklonal anti- β -tubulin antibody (murin)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle III.8 Liste der Zellkulturmedien und Zusätze

Produkte	Bezugsquelle
RPMI 1640	Sigma
RPMI 1640 (phenolrotfrei, L-argininfrei, L-lysinfrei, Ca (NO ₃) ₂ -frei)	Biochrom, Berlin, Deutschland
FCS (Gold Standard), Glutamax, Penicillin-Streptomycin, HEPES-Buffer, Trypsin	PAA Laboratories, Pharmingen, Deutschland
Kunststoffteile, Kulturflaschen, -dishes	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

1.4 Bakteriennährmedium

LB-Medium nach Miller 1972

10,0 g/L	Trypton
5,0 g/L	Hefeextrakt
0,7 g/L	CaCl ₂ ·2H ₂ O
15 g/L	Agar

1.5 Sonstige Chemikalien

Tabelle III.9 Liste der sonstigen Chemikalien

Produkte	Bezugsquelle
L-N-(5)-(1-Iminoethyl)ornithin (NIO)	Alexis, Lausen, Schweiz
SNOC; DETA/NO	Prof. Dr. Kröncke, Düsseldorf
PVDF-Membran	Amersham Bioscience Europe, Freiburg, Deutschland

2. Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zellkulturen in Standard-Medium

Alle Zellen wurden in 6-Loch Platten oder 10 cm Petrischalen ausgesät. Experimente, die die Bestimmung der Luziferaseaktivität beinhalten, wurden mit Zellen durchgeführt, die in 12-Loch Platten kultiviert wurden. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen in RPMI 1640 supplementiert mit 10% FCS, 100 µg Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 1% Glutamax bei 37°C in einer feuchten, 5% CO₂ beinhaltenen Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.1.2 Zellkulturen mit modifiziertem Medium

Für viele Experimente wurden die murinen Keratinozyten in speziell angefertigtem Medium kultiviert. Dieses phenolrot-, nitrit- und nitratfreie sowie L-arginin- und L-lysinfreie RPMI 1640 wurde abweichend vom Standard RPMI wie folgt supplementiert: 5% FCS, 200 µM CaCl₂, 220 µM L-Lysin and 50 µM L-Arginin. Für Experimente wurden die Zellen mit den angegebenen L-Argininkonzentrationen kultiviert und der FCS-Anteil im Versuchsmedium auf 2% gesenkt, um das Angebot an L-Arginin nicht durch den Anteil des L-Arginins im FCS zu erhöhen.

2.1.3 Zytokinaktivierung

Die Zytokinaktivierung der Zellen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit je 500 U/ml Interleukin-1β, Tumornekrosefaktor-α, und Interferon-γ durchgeführt. Die Zellen wurden dann für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Zur Analyse der iNOS Promotoraktivität wurden die Zellen mit dem gleichen Zytokinmix aktiviert.

2.1.4 Bestimmung der Apoptose mit Hoechst-Färbung

Die Detektion der nukleären Chromatinkondensation und der nukleären Fragmentation wurde mittels Hoechst H33342-Färbung durchgeführt. Nach verschiedenen Behandlungen wurden die Zellen mit 10 µl/ml Medium einer Hoechst H33342 (10 µg/ml)-Färbelösung für fünf Minuten inkubiert und auf Apoptose untersucht. Die Nuklei wurden mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop mit dem Zeiss Filtersatz 02 (Excitation: 351 nm, Emission: 461 nm) sichtbar gemacht. Von jeder Probe wurden mindestens 400 Zellen gezählt und die kondensierten oder fragmentierten Nuklei als Prozent der Gesamtzahl angegeben.

2.1.5 Bestimmung der Nekrose mittels Propidiumiodid-Färbung

Die Durchlässigkeit der Zellwand wurde mittels 10 µl/ml Medium Propidiumiodid Färbelösung (1 µg/ml) nach zweiminütiger Inkubation bestimmt. Zur Zellzählung wurde ein Zeiss Fluoreszenzmikroskop mit dem Zeiss Filtersatz 02 (Excitation: 488 nm, Emission: 617 nm) benutzt. Von jeder Probe wurden mindestens 400 Zellen gezählt und die kondensierten oder fragmentierten Nuklei als Prozent der Gesamtzahl angegeben.

2.1.6 Bestimmung der Zellzahl mittels Neutralrot

Da die Extinktion von Neutralrot direkt mit der Zellzahl korreliert, kann man Neutralrot benutzen, um die Zellzahl zu bestimmen. Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen für 60 Minuten im Dunkeln mit einer 1:100 Verdünnung einer 3% Neutralrotlösung in Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit saurer Isopropanollösung (250 µl; 1% HCl) lysiert. Die Lösung wurde abgenommen, kurz zentrifugiert und im Microplatereader bei 530 nm gemessen.

2.1.7 Probenvorbereitung für Analysen mit dem Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorting-FACS*)

Für diese Versuche wurden 15.000 Zellen in einer 10 cm Petrischale ausgesät und mit 2% FCS und 1 mM L-Arginin für 48 Stunden kultiviert. Dann erfolgte wiederum für 48 Stunden ein Medienwechsel auf Medium mit den angegebenen L-Argininkonzentrationen. Die Zellen wurden dann trypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und unter vortexen in der *FACS*-Lösung (50 µg/ml PI; 0,1 % w/v Na-Citrat; 0,1% Triton x100; 40 µg/ml RNaseA in H₂O (4°C)) aufgenommen. Die propidiumiodidgefärbten Kerne konnten dann auf ihren DNA-Gehalt untersucht und den Zellzyklusphasen zugeordnet werden.

Die Auswertung der mit dem *FACS* generierten Daten erfolgte mit der WinMDI 2.8 Software (Copyright[©] 1993-1998 by Joseph Trotter).

2.2 Biochemische/immunologische Methoden

2.2.1 Bestimmung der NOS-Aktivität mittels Griess-Test

Die iNOS Aktivität wurde indirekt über die Nitritakkumulation in 100 µl Kulturüberstand in 6-Loch Zellkulturschalen mittels Diazotierungsreaktion bestimmt [99]. Für die Reaktion werden zwei Lösungen benötigt: Griess I (1% Sulfanilamid; 2,5% H₃PO₄) und Griess II

(0,3% Naphtylendiamin; 2,5% H_3PO_4). Die Intensität der Farbreaktion kann kolorimetrisch bei 540 nm bestimmt werden. In Medium gelöstes NaNO_2 wurde als Standard benutzt.

Der NOS-Inhibitor L-N-(5)-(1-Iminoethyl)ornithin (NIO) wurde in einer 250 μM Endkonzentration eingesetzt.

2.2.2 Verwendung von NO-Donoren

Die NO-Donoren S-Nitrosocystein (SNOC) und DETA/NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino] diazen-1-ium-1,2-diolat) wurden freundlicherweise von Prof. Kröncke zur Verfügung gestellt [100].

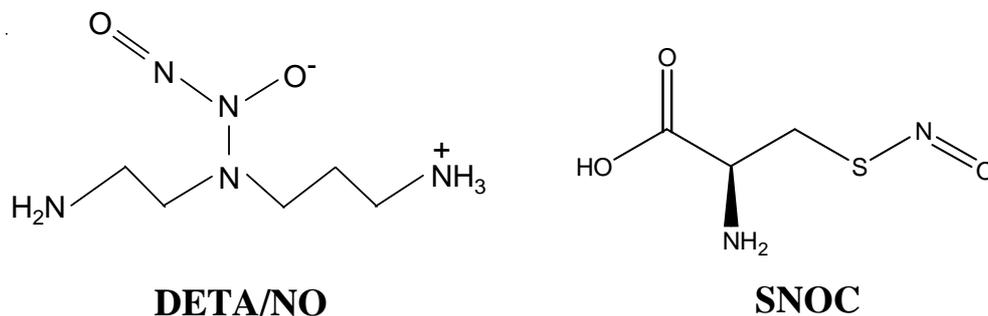


Abb. 2.1 Chemische Strukturformeln der NO-Donoren DETA/NO und SNOC

2.2.3 Arginaseaktivitätsbestimmung

Der Assay wurde durchgeführt wie bei Corraliza beschrieben [101]. Die Zellen wurden lysiert und mit 10 mM MnCl_2 bei 55°C für 10 Minuten inkubiert. Dann wurde das gleiche Volumen 0,5 M L-Arginin hinzugefügt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 800 μl eines Säure-Gemisches ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O} = 1:3:7$) wurde die Reaktion gestoppt. Der synthetisierte Harnstoff wurde bei 540 nm nach Zugabe von 50 μl einer 9% α -Isonitrosopropionphenon (ISPF)-Lösung und Erhitzen auf 96°C für 45 Minuten kolorimetrisch quantifiziert.

2.2.4 Western Blots

Die Zellen wurden gewaschen, lysiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für fünf Minuten in Elektrophorese-Puffer gekocht. Die Proteine (20-30 μg pro Spur) wurden dann mittels Elektrophorese in einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde für eine Stunde in Blocking-Puffer (5% fettarmes Milchpulver, 0,1% Tween 20 in TBS Puffer) geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte μN bei 4°C mit einer 1:1000 Verdünnung des Antikörpers. Darauf folgend wurde die Membran eine Stunde mit einer 1:2000 Verdünnung des sekundären Antikörpers, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war, bei Raumtemperatur inkubiert.

Schließlich wurden die Blots für fünf Minuten in ECL-Reagenz inkubiert und die Signale mit Hilfe eines Hyperfilms detektiert. Um die gleichmäßige Beladung der Taschen zu kontrollieren, wurden die Blots zudem mit einem Anti- α -Aktin Antikörper in der Verdünnung 1:2000 behandelt.

2.2.5 Isolierung der Kernextrakte und *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Die Isolierung der Kernextrakte wurde mit Hilfe des Active Motif Nuclear Extract Kit gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Überprüfung der Trennung der nukleären von der zytosolischen Fraktion erfolgte mit einem Maus-anti- β -Tubulin Antikörper. Die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität wurde mittels EMSA bestimmt, wobei das LightShift Chemiluminescent EMSA Kit dem Herstellerprotokoll folgend benutzt wurde. Die nukleären Extrakte (2,5 μ g) wurden mit 20 fmol eines doppelsträngigen Oligos, der die NF- κ B Bindungssequenz des murinen iNOS Promotors enthält (5'-CAACTGGGGACTCTCCCTTTG-3') für 30 Minuten bei RT inkubiert.

2.2.6 Bestimmung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen

Hierfür wurden die Zellen in einer 10 cm Petrischale mit modifizierten RPMI 1640 mit 50 μ M L-Arginin bis zu einer Konfluenz von ca. 50% kultiviert. Dann wurden die Zellen mit FCS-reduziertem (2%) RPMI mit den angegebenen L-Argininkonzentrationen für 48 Stunden behandelt. Danach waren die Zellen 80-90% konfluent. Zu den mit PBS gewaschenen Zellen wurden 150 μ l Proteinlysepuffer gegeben und die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst. So ergab sich ein Gesamtvolumen von ungefähr 300 μ l, das in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 75 μ l 10%iger Sulfosalicylsäure versetzt wurde. Die gevortexten Proben wurden 30 Minuten bei 4-8°C gelagert, fünf Minuten zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Diese wurden dann bei -20°C gelagert. Die Analyse der Aminosäuren wurde im Medizinischen Labor Bremen, Prof. Kühn-Velten, mittels HPLC durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 Quantitative Genexpressionsanalyse

Real-time RT-PCR's mit dem LightCycler 2.0[®] (Roche Diagnostics) wurden in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt, welches 4 μ l cDNA (1:5 verdünnt), 2 μ l Fast Start Reaction Mix SYBR GreenI, 1,6 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l jedes Primers in der Konzentration 5 pmol/ μ l und 8,4 μ l H₂O beinhalteten. Primer und PCR Bedingungen sind in Tabelle III.4 aufgeführt. Als Negativekontrolle wurde H₂O eingesetzt. Nach dem Beenden des PCR-Programms wurde

mit den Proben eine Schmelzkurvenanalyse mit Hilfe eines Temperaturgradienten und der Aufnahme der Fluoreszenz durchgeführt. Für jedes PCR-Produkt (außer den Primer-Dimern) wurde ein einzelner, spezifischer Peak generiert. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann die spezifische Schmelztemperatur bestimmt werden. Zur weiteren Kontrolle wurden die Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen und überprüft, dass nur eine einzelne Bande der vorhergesagten Größe identifiziert werden konnte. Das indiziert eine spezifische Amplifikation ohne Nebenprodukte. Die relative Quantifizierung der Proben wurde mit dem Haushaltsgen GAPDH zur Normierung unter Verwendung der LightCycler Software 4.05 durchgeführt.

2.3.2 Bestimmung des *Mycoplasma hyorhinis* Titers

Die Anzahl der *M. hyorhinis* Genomkopien wurde via *real-time* PCR mit dem LightCycler bestimmt. Die Proben wurden wie folgt behandelt: 400 µl des Zellkulturüberstandes wurden für 15 Minuten bei 15.000 U/min zentrifugiert; das Pellet wurde in 25 µl Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert, in 50 µl Proteinase K-Puffer (100 µg/ml Proteinase K; 0,5% Tween 20 in 10 mM Tris/HCl) gelöst, für 60 Minuten bei 56°C inkubiert und für 30 Minuten bei 96°C denaturiert [102]. 2,5 µl dieser Verdünnung wurden in eine 25 µl PCR-Reaktion mit dem folgenden PCR-Programm: 5 min 5°C, 45 x (30 s 95°C; 30 s 55°C; 30 s 72°C) eingesetzt. Als Primer wurde der VenorGM Mix (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) benutzt. Als Standard wurde ein Amplifikat von *M. hominis* mit bekannter Kopienzahl verwendet. Das Amplifikationsprodukt wurde kloniert und sequenziert. In den Experimenten wurde eine Konzentration von $1,5 \times 10^8$ Genomkopien/ml eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte am Institut für Medizinische Mikrobiologie durch B. Henrich.

2.3.3 Sequenzierung der PCR-Fragmente und Vektoren

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA (mind. 100 ng) wurde für die Sequenzierreaktionen mit den gleichen Primern, die auch für die PCR benutzt wurden, eingesetzt. Vektoren wurden mittels QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Das Sequenzieren wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den GenBank Sequenzen verglichen (Table III.4).

2.3.4 Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in stabil transfizierten Zellen

Die NF- κ B-Aktivität wurde mit stabil transfizierten A549/8 Zellen bestimmt, vor deren Luziferase-Reportergen eine NF- κ B-Konsensussequenz kloniert ist [103]. Die Zellen wurden unterschiedlich behandelt und für acht Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Reporter-Gene-Assay-Lysis-Buffer (Roche Diagnostics) lysiert. Die Luziferaseaktivität wurde nach Zugabe von 100 μ l Bright Light Substrate (Pierce) zu 50 μ l Proteinextrakt bestimmt. Die Messungen wurden in einer weißen 96-Loch Platte mit einem Chemiluminometer (Wallac Bioanalytik Instrumente, Freiburg, Germany) durchgeführt. Zur Normierung der Chemolumineszens wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt.

2.3.5 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterienkolonien auf Festmedium erfolgte durch einen Einzelkoloniausstrich mit anschließender Inkubation im Brutschrank. Die *E. coli* Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C ü/N inkubiert.

Die Kultivierung von Bakterien im Flüssigmedium erfolgte durch das Animpfen mit einer Einzelkolonie von einer Stammpatte. Je nach Maßstab der Kultivierung erfolgte die Inkubation in Reagenzgläsern (5-10 ml) oder in Erlenmeyerkolben (> 250 ml). *E. coli*-Zellen wurden ü/N angezogen, für größere Ansätze wurden Vorkulturen angelegt.

2.3.6 Plasmid-DNA-Isolierung

2.3.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Zellsuspension musste zunächst mit 13.000 U/min zentrifugiert werden, dann wurde das Pellet lysiert. Zur Plasmidisolierung wurde eine alkalische Lyse der Bakterienzellen durchgeführt [104]. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde durch Adsorption, Waschen und anschließende selektive Elution von einer Silikasäule erreicht. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Restriktionsanalyse, als Matrizen-DNA für eine PCR, zur Transformation und zur Sequenzierung eingesetzt. Aus einer Flüssigkultur wurden hierfür 3 ml verwendet, zentrifugiert und in Lysepuffer resuspendiert.

2.3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Nucleobond MAXI AX-100 EF Kit

Auch diese Plasmidisolierung basiert auf einer alkalischen Lyse, die Aufreinigung erfolgt über eine Ionenaustauschersäule. Mit diesem Kit ist es möglich, große Mengen (>500 μ g) an Plasmid-DNA zu isolieren. Die gewonnene Plasmid-DNA ist endotoxinfrei, was für eine

anschließende Transfektion wichtig ist, um eine Immunantwort der Zellen auf die Endotoxine zu vermeiden. Hierfür wurden 200-250 ml einer Bakterienkultur eingesetzt.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA, DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden in Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die DNA-Proben wurden mit einer Bromphenolblau (BPB)-Lösung vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung richtete sich nach Größe und Agarosekonzentration des Gels und variierte zwischen 60 und 100 V. Die Laufdauer richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente und lag zwischen 30 Minuten und einer Stunde. Die Agarosekonzentration der Gele richtete sich wiederum nach der Größe der zu trennenden Fragmente; je größer die Fragmente, desto geringer die Agarosekonzentration.

2.3.8 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments in einem Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Die Größenbestimmung erfolgte durch einen Vergleich mit den Laufstrecken der DNA-Fragmente des DNA-Längenstandards X der Firma Roche oder Fermentas GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

2.3.9 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

In dieser Arbeit wurden nur Restriktionsendonukleasen vom TypII verwendet. Diese erkennen und schneiden spezifisch palindromische Sequenzen auf der Ziel-DNA. Die Enzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen. Für die Reaktionsansätze wurde der entsprechende Puffer verwendet. Für eine Spaltung wurde 1 µg DNA in einem Ansatz mit 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Weiter wurden jeweils 0,5 µl des Restriktionsenzym benutzt, der Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und 3-5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.3.11 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA wurde gemäß den Protokollen der Hersteller durchgeführt. Ein Vial kompetenter Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und 3-6 µl der Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde dann für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeschockbehandlung: 30 Sekunden bei 42°C. Die Hitze steigerte die Fluidität der Zellmembran, was eine Aufnahme der Plasmid DNA kombiniert mit folgendem Kälteschock (auf Eis für zwei Minuten) ermöglichte. Um den Zellen eine Regenerationsmöglichkeit zu geben, wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben. Die

Suspension wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann unverdünnt und 1:10 verdünnt auf Selektivplatten ausplattiert

2.3.12 Extraktion von DNA-Fragmente aus dem Gel

Zur Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde die GFX PCR-Säulen von GE Healthcare verwendet. Diese Methode erlaubte die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel. Dazu wurden Säulen mit Fiberglas-Matrix verwendet. Man schneidet einen Agaroseblock aus, der die entsprechende Bande enthält, gibt die entsprechende Menge Capture buffer hinzu und erhitzt das Gemisch auf 60°C. Die Lösung wurde über die Säule gegeben, um die DNA zu binden, die dann mit dem Waschpuffer von Proteinen und Salzen gereinigt wurde. Die DNA wurde mit TE-Puffer eluiert.

2.3.13 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von DNA-Fragmente oder PCR-Produkten erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Der Vektor und das zu klonierende Fragment wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt.

2.3.14 RNA Isolation und reverse Transkription

Die Gesamt-RNA wurde aus 6-Loch Platten mittels des RNeasy-Kits gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Die RNA jeder Probe wurde in 30 µl RNase-freien Wassers aufgenommen und bei -70°C gelagert. Die cDNA-Synthese wurde in einem Volumen von 20 µl mit 1 µg Gesamt-RNA durchgeführt, reverse Transkriptase, oligo d(T)₁₅ Primer und Deoxyribonucleosid Triphosphat wurden gemäß dem Handbuch eingesetzt. Fünf Mikroliter der resultierenden cDNA Proben wurden für eine PCR-Amplifikation in einem Volumen von 50 µl eingesetzt, die 5 µl 10x PCR Puffer, 1 µl 10 mM Deoxyribonucleosid Triphosphat, 1 µl jeden Primers [20 pmol/µl] und 1 U Taq-Polymerase beinhalten. Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabelle III.4 aufgelistet. Vor der PCR-Analyse wurde die adäquate Zyklenzahl für jede PCR-Reaktion bestimmt um zu gewährleisten, dass die Amplifikationsbedingungen sich in der linearen Phase befanden. Für die Gel-Elektrophorese wurden 1% Agarose-Gele verwendet. Die Banden wurden mittels Ethidiumbromidfärbung detektiert. Zur densitometrischen Analyse der PCR-Amplifikate wurde die AIDA 2.43 2D Multilabeling Software (RPZG GmbH, Berlin, Germany) eingesetzt.

2.4 Statistische Analysen

Vergleich zweier Mittelwerte mit dem Student's t-Test

Mit dem Student's t-Test werden die Mittelwerte zweier normalverteilter Stichproben verglichen. Die Werte wurden als signifikant angenommen, wenn $p < 0,05$, als hochsignifikant, wenn $p < 0,001$.

IV. Ergebnisse

1. Untersuchungen zu den regulatorischen Effekten der L-Argininverfügbarkeit auf die Expression der iNOS

Über das genregulatorische Potential der bedingt essentiellen kationischen Aminosäure L-Arginin war zu Beginn dieser Arbeit kaum etwas bekannt. Gerade ist der neue Begriff „*argenomics*“ eingeführt worden, um den neuen, wenn auch noch wenigen, Erkenntnissen Rechnung zu tragen. Hingegen war schon bekannt, dass das freie Radikal NO an der Regulation der Genexpression beteiligt ist [81,105,106]. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die induzierbare NO-Synthase, weil diese unter proinflammatorischen Bedingungen bolusartig große Mengen NO herstellt.

Da die iNOS-abhängige NO-Synthese die Hauptquelle für NO in den Zellen ist und diese als Substrat L-Arginin benötigt, wurde die iNOS als Zielgen ausgesucht. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine verminderte L-Argininverfügbarkeit genregulatorische, translationelle oder posttranslationelle Effekte in Keratinozyten hat.

1.1 Etablierung eines Zellsystems zur Simulierung limitierter L-Argininverfügbarkeit

Um die angestrebten Studien durchführen zu können, wurde ein Zellsystem benötigt, das es ermöglichte, verschiedene extrazelluläre L-Argininkonzentrationen einzustellen, wobei gewährleistet sein musste, dass diese sich wiederum intrazellulär widerspiegeln.

Dafür wurde ein Zellmodell etabliert, mit dem durch die extrazelluläre Regulation der Verfügbarkeit von L-Arginin auch der intrazelluläre Pool beeinflusst wird. Hierfür wurde die murine Keratinozytenzelllinie PAM212, die normalerweise in RPMI 1640 Vollmedium kultiviert wird, in Gegenwart einer erniedrigten L-Argininkonzentration kultiviert. Ziel war es, den intrazellulären L-Argininvorrat zu reduzieren, den Zellen aber gleichzeitig genug L-Arginin zur Verfügung zu stellen, um ein logarithmisches Wachstum zu ermöglichen. Mit dem in dieser Arbeit etabliertem Zellsystem lassen sich verschiedene L-Argininkonzentrationen extrazellulär simulieren. Zur Kontrolle dieses Systems wurde die intrazelluläre, freie L-Argininkonzentration bestimmt. Die Analyse ergab, dass die gemessene intrazelluläre Konzentration annähernd den L-Argininkonzentrationen, die extrazellulär zur Verfügung gestellt wurden, entsprach (Tab. 1). Andere Aminosäuren wurden nur leicht beeinflusst. Somit wurde ein Zellsystem etabliert, das sich ideal dazu eignet, die intrazellulären Reaktionen auf ein vermindertes L-Argininangebot zu verfolgen.

Tab.1: Intrazellulärer Aminosäuregehalt von PAM212 Zellen in Abhängigkeit von extrazellulärem L-Arginin

Die Zellen wurden lysiert, enteweiß und mittels HPLC auf die verschiedenen Aminosäurekonzentrationen untersucht. Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Aminosäuren [μ mol/L]	L-Arginin [μ mol/L]				RPMI1640 [μ mol/L]
	0	50	100	1000	
L-Alanin	467 \pm 194	588 \pm 222	849 \pm 84	898 \pm 92	-
L-Arginin	nw	48 \pm 27	88 \pm 11	760 \pm 33	-
L-Asparagin	510 \pm 225	608 \pm 235	858 \pm 28	913 \pm 44	378
L-Aspartat	nw	nw	63 \pm 5	64 \pm 5	-
L-Citrullin	nw	nw	nw	nw	-
L-Cystein	nw	nw	nw	nw	413
L-Glutamin	213 \pm 124	186 \pm 97	213 \pm 29	246 \pm 14	2054
L-Glutaminsäure	160 \pm 69	167 \pm 71	235 \pm 22	258 \pm 28	-
Glycin	nw	nw	nw	nw	133
L-Histidin	nw	nw	68 \pm 8	78 \pm 7	97
L-Hydroxyprolin	84 \pm 45	111 \pm 57	165 \pm 9	173 \pm 18	174
L-Iso-Leucin	235 \pm 92	204 \pm 78	271 \pm 12	317 \pm 6	382
L-Leucin	262 \pm 99	234 \pm 70	314 \pm 5	352 \pm 6	382
L-Lysin	257 \pm 114	243 \pm 116	302 \pm 29	292 \pm 43	274
L-Methionin	103 \pm 46	102 \pm 38	138 \pm 7	154 \pm 10	101
L-Ornithin	nw	nw	nw	nw	-
L-Phenylalanin	118 \pm 44	116 \pm 34	164 \pm 15	180 \pm 11	91
L-Prolin	202 \pm 95	246 \pm 103	353 \pm 31	366 \pm 19	174
L-Serin	304 \pm 97	420 \pm 150	558 \pm 34	583 \pm 23	256
Taurin	436 \pm 67	468 \pm 73	581 \pm 53	550 \pm 33	-
L-Threonin	262 \pm 99	307 \pm 100	418 \pm 22	456 \pm 27	168
L-Tryptophan	nw	nw	39 \pm 1	47 \pm 1	25
L-Tyrosin	135 \pm 50	138 \pm 44	188 \pm 15	208 \pm 11	110
L-Valin	159 \pm 61	139 \pm 50	205 \pm 22	224 \pm 3	171

nw = nicht nachweisbar (<10 μ M)

1.2 Eingeschränkte L-Argininverfügbarkeit führt zu einer Induktion der iNOS mRNA-Expression

Die iNOS mRNA-Expression war durch die verminderte L-Argininverfügbarkeit in Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen induziert (2,8 \pm 1,5 vs. 1 [0 μ M L-Arginin vs. 1000 μ M L-Arginin]) (Abb. 1.1 A). Mit sinkenden L-Argininkonzentrationen stieg die Expression der iNOS mRNA, verglichen mit Zellen, die unter Standardkulturbedingungen mit 1 mM L-Arginin kultiviert wurden, dosisabhängig in Abwesenheit von Zytokinen an. Um aufzuklären, ob dieser Effekt L-argininspezifisch war, wurden dieselben Experimente in Abwesenheit von L-Lysin, aber mit 1 mM L-Arginin durchgeführt. Eine L-Lysin-depletion war nicht in der Lage, die iNOS mRNA zu induzieren (Abb. 1.1 A), vielmehr entsprach die iNOS mRNA-Expression der basalen Expression in Vollmedium. Als Positivkontrolle wurde eine zytokinaktivierte Probe mitgeführt.

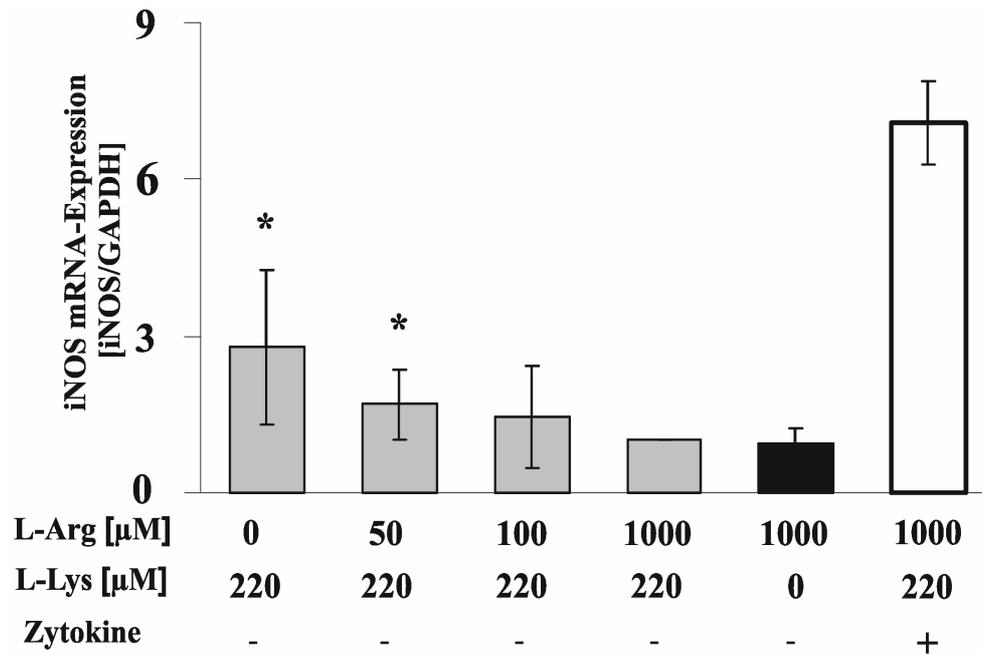


Abb. 1.1 iNOS mRNA-Expression in Abhängigkeit von L-Arginin

Dargestellt ist die iNOS mRNA-Expression in L-Argininabhängigkeit und in L-lysinfreiem Medium. Die mRNA wurde aus Zellkulturproben isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen *real-time* PCR Primern für die murine iNOS (170 bp) und GAPDH (223 bp) quantitativ amplifiziert. Die GAPDH wurde als Haushaltsgen zur Normierung der Proben eingesetzt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 µM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

1.3 In aktivierten Zellen bewirkt die verminderte L-Argininverfügbarkeit eine starke Erhöhung der iNOS mRNA-Expression

Nachdem in residenten Zellen eine Induktion der iNOS mRNA in Folge einer verminderten L-Argininverfügbarkeit detektiert wurde, wurden die Versuche in Anwesenheit von Zytokinen wiederholt. Die zytokininduzierte iNOS mRNA-Expression wurde durch eine verminderte L-Argininverfügbarkeit bis zu 20-fach erhöht (Abb. 1.2).

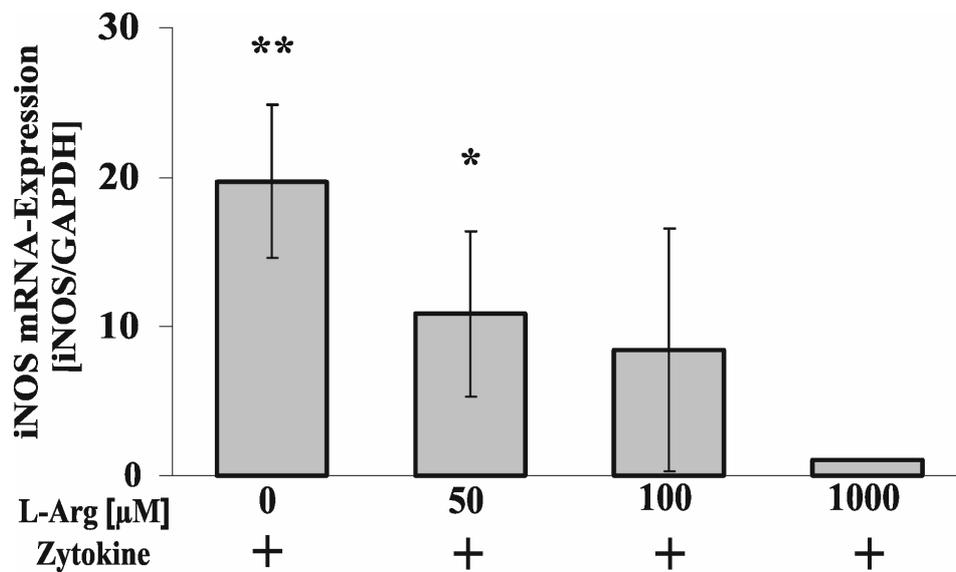


Abb. 1.2 iNOS mRNA-Expression in Gegenwart von Zytokinen in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration

Die mRNA wurde aus Zellkulturproben isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen *real-time* PCR Primern für die murine iNOS (170 bp) und GAPDH (223 bp) quantitativ amplifiziert. Die GAPDH wurde als Haushaltsgen zur Normierung der Proben eingesetzt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 μM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

In Versuchen mit dem mRNA-Syntheseinhibitor ActinomycinD (5 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden) konnte kein Anstieg der iNOS mRNA-Synthese nachgewiesen werden (Abb. 1.2.1).

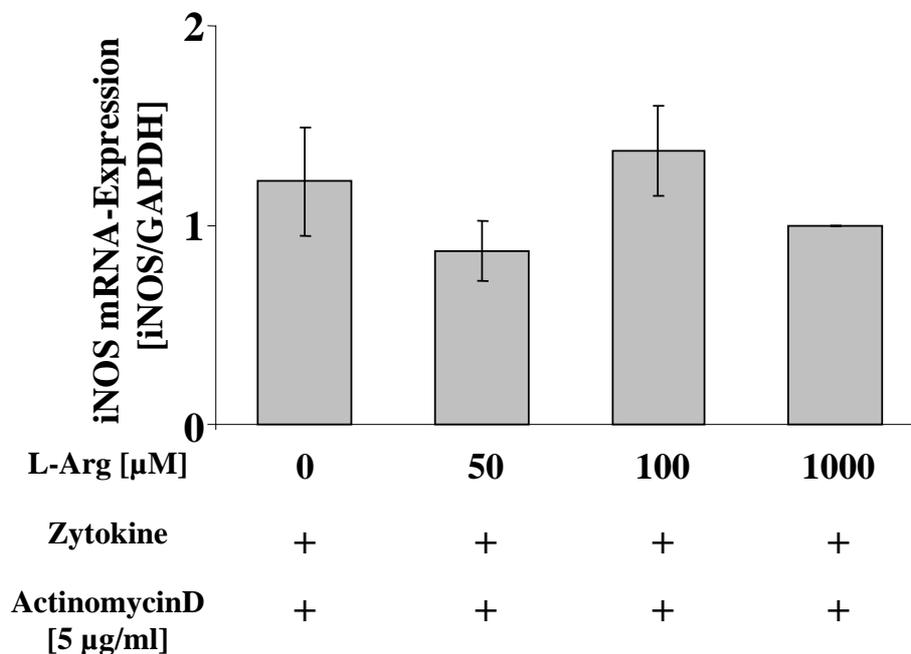


Abb. 1.2.1 iNOS mRNA-Expression in Gegenwart von Zytokinen und ActinomycinD in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration

ActinomycinD (5 $\mu\text{g/ml}$) wurde für 24 Stunden eingesetzt, um die Transkription zu inhibieren. Die mRNA wurde aus Zellkulturproben isoliert, revers transkribiert und mit spezifischen *real-time* PCR Primern für die murine iNOS (170 bp) und GAPDH (223 bp) quantitativ amplifiziert. Die GAPDH wurde als Haushaltsgen zur Normierung der Proben eingesetzt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 μM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Weiterhin sollten die Fragen beantwortet werden, wodurch die angestiegene iNOS mRNA-Expression reguliert wird und ob sich die verstärkte Expression der iNOS mRNA auch in der Proteinsynthese widerspiegelte.

1.4 Die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität wird durch eine verminderte L-Argininverfügbarkeit erhöht

Um die Auswirkungen verschiedener extrazellulärer L-Argininkonzentrationen auf die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität zu bestimmen, wurden murine Keratinozyten in Medium mit verschiedenen L-Argininkonzentrationen in An- und Abwesenheit von Zytokinen kultiviert. Mit Gelshift-Experimenten sollte die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität analysiert werden. Mit dieser Technik lässt sich die Bindung eines Transkriptionsfaktors an eine für ihn spezifische DNA-Sequenz und damit seine Lokalisation im Kern untersuchen.

Eine verminderte extrazelluläre L-Argininverfügbarkeit führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität. Diese Reaktion zeigten die Keratinozyten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Zytokinen (Abb. 1.3 A). Die Aktivierung durch Zytokine führte zu einer Translokation des Faktors in den Kern. Diese Aktivierung wurde durch eine Verminderung des L-Argininangebots noch weiter gesteigert (Abb. 1.3).

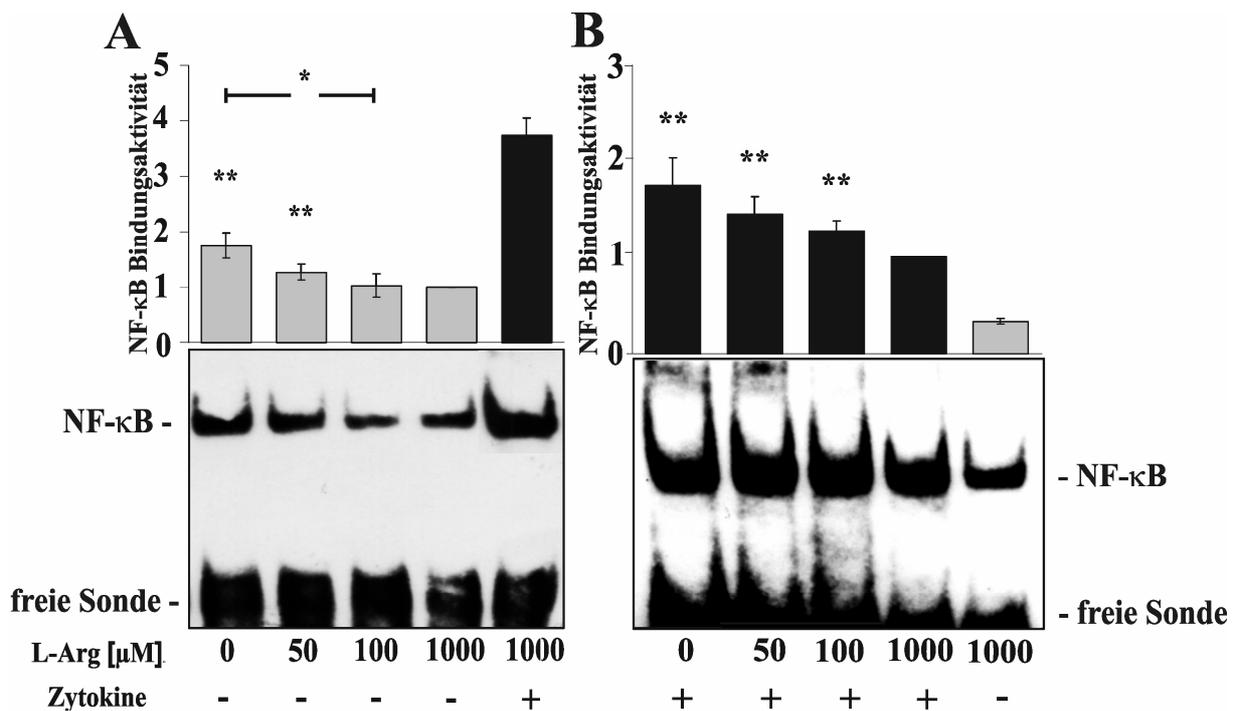


Abb. 1.3 NF- κ B DNA-Bindungsaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen L-Argininkonzentrationen

Zum Nachweis der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität wurden die nukleären Extrakte aus PAM212 Zellen isoliert, die in modifiziertem Medium für 48 Stunden mit den angegebenen L-Argininkonzentrationen kultiviert wurden. Die Aktivierung mit Zytokinen erfolgte für 90 Minuten. Die DNA-Bindeaktivität wurde mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) nachgewiesen. Die Experimente wurden in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Zytokinen durchgeführt * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 μ M L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

1.5 Die iNOS Proteinexpression nimmt dosisabhängig mit der L-Argininkonzentration

ab

Die Induktion der iNOS mRNA-Expression in Abwesenheit von Zytokinen war nicht ausreichend, um die Translation in iNOS Protein einzuleiten (Abb. 1.4 B). Als Positivkontrolle wurde eine zytokinaktivierte Probe mitgeführt.

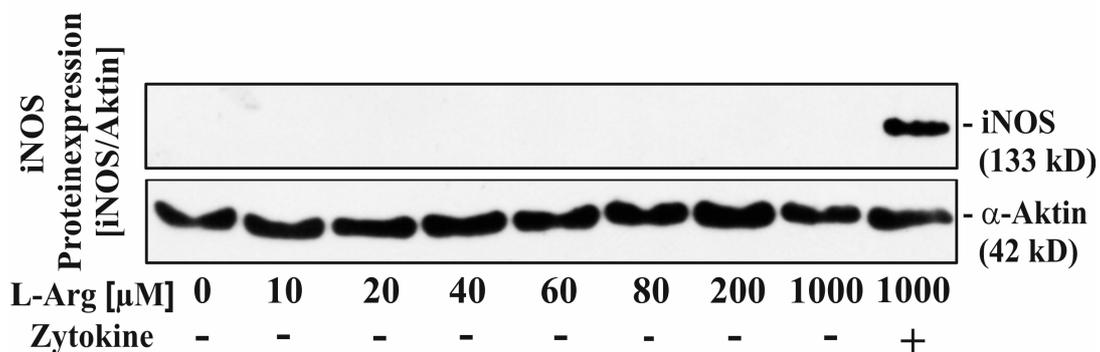


Abb. 1.4 iNOS Proteinexpression in residenten Zellen in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration

Die Proteine wurden mittels Western Blot in Zelllysaten detektiert. Als Positivkontrolle wurde eine aktivierte Probe mitgeführt. Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern für die murine iNOS und α -Aktin nachgewiesen. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu dem starken Anstieg der iNOS Proteinexpression in Anwesenheit von Zytokinen und Abwesenheit von L-Arginin führte die verminderte L-Argininverfügbarkeit auf der Proteinebene zu einer Verminderung der iNOS Proteinexpression (Abb. 1.5). Der Effekt war wiederum dosisabhängig, je weniger L-Arginin vorhanden war, desto weniger iNOS Protein war vorhanden. Die Proteinexpression war auf ca. 30% (0 μM vs. 1000 μM L-Arginin) reduziert.

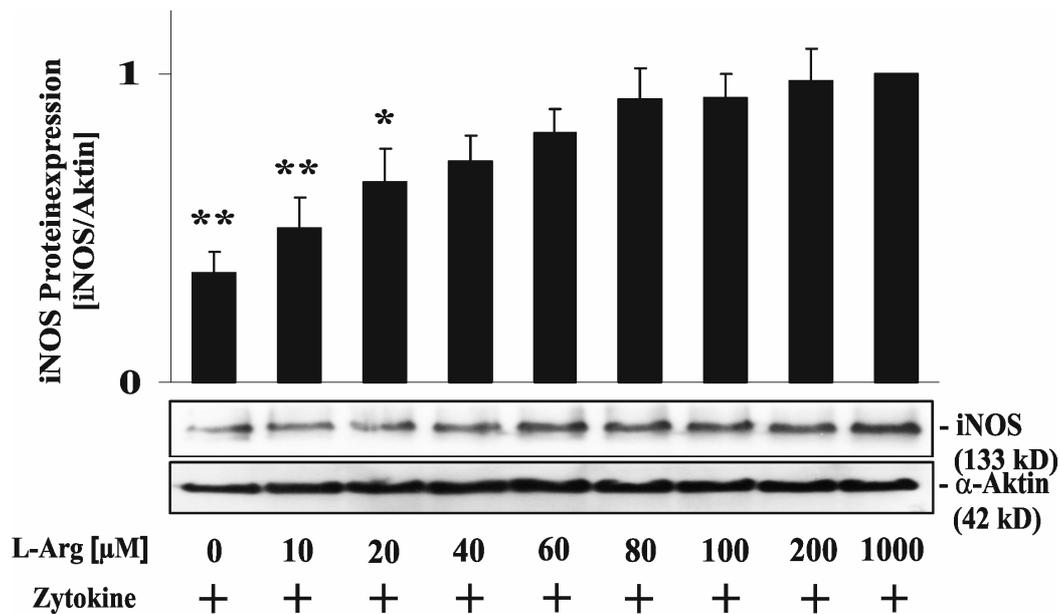


Abb. 1.5 Die iNOS Proteinexpression in Abhängigkeit von dem L-Argininangebot
Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern mittels Western Blot in Zelllysaten detektiert.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 μM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

1.6 Regulation der Translation durch die L-argininabhängige Phosphorylierung der Translationsinitiationsfaktor-Untereinheit eIF2 α

Der Phosphorylierungsstatus der Translationsinitiationsfaktor-Untereinheit eIF2 α an Ser51 ist ein Hauptregulationsmechanismus der zellulären Translation in eukaryotischen Zellen [107]. Verschiedene Stresssituationen wie UV-Bestrahlung, ER-Stress und Aminosäuren-Depletion können in Zellen eine Phosphorylierung von eIF2 α und damit die Inhibition der Translation hervorrufen [97]. Um die inverse Regulation der iNOS mRNA- und der iNOS Proteinexpression durch die L-Argininverfügbarkeit aufzuklären, wurde der Phosphorylierungsstatus von eIF2 α in Abhängigkeit von der extrazellulären L-Argininkonzentration untersucht.

In Abwesenheit von Zytokinen steigerte sich die Phosphorylierung von eIF2 α mit abnehmender L-Argininkonzentration (Abb. 1.6 A). Auffällig ist, dass sich zwischen 40 und

60 μM L-Arginin die Phosphorylierung in Abwesenheit von Zytokinen verdoppelte ($3,9 \pm 0,2$ vs. $1,9 \pm 0,3$ [phospho-eIF2 α /total eIF2 α]).

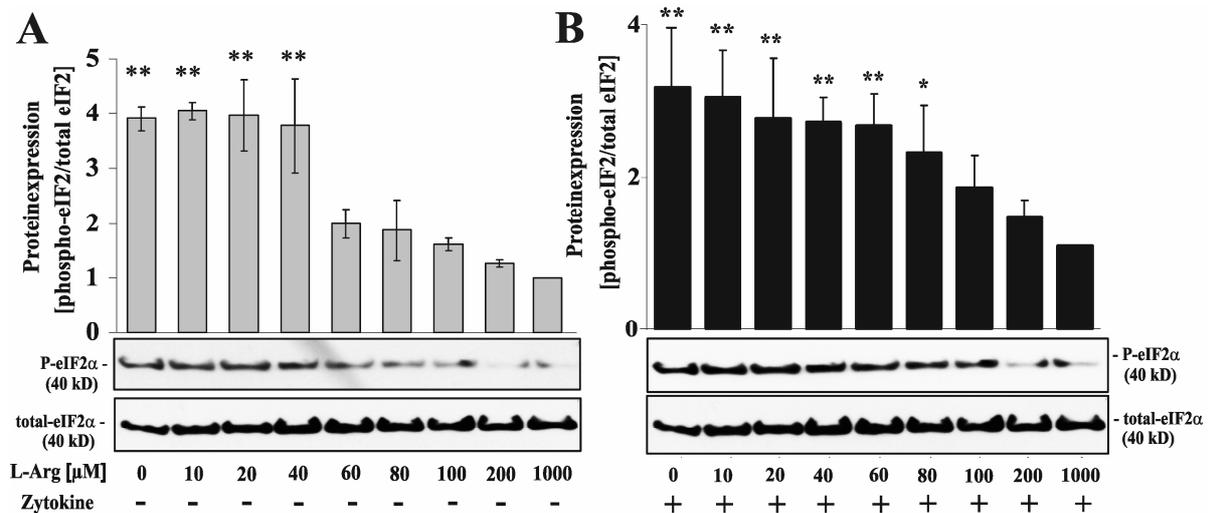


Abb. 1.6 Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors eIF2 α in Abhängigkeit von der L-Argininverfügbarkeit

Der Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors wurde mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern für den Phosphorylierungsstatus in Zellysaten nachgewiesen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 μM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

In zytokinaktivierten Zellen dagegen nahm die eIF2 α Phosphorylierung mit erniedrigter L-Argininverfügbarkeit gleichmäßig zu (Abb. 1.6 B). Die Phosphorylierung von eIF2 α (Ser51) stieg verglichen mit dem Phosphorylierungsstatus bei 1 mM L-Arginin signifikant im Bereich zwischen 100 und 60 μM L-Arginin an.

1.7 Analyse der iNOS Aktivität

Die Aktivität der iNOS nahm mit verminderter L-Argininverfügbarkeit ab. Diese Ergebnisse bestätigen damit die Resultate der Proteinexpressionsanalyse. Die beiden höchsten L-Argininkonzentrationen (200 und 1000 μM) verhalten der iNOS zur maximalen Aktivität (Abb. 1.7), obwohl bei der Proteinexpression kein Unterschied zu erkennen war. So sind zwei Gründe für die verminderte iNOS Aktivität zu erkennen, zum einen die verringerte Proteinexpression, zum anderen die eingeschränkte L-Argininverfügbarkeit.

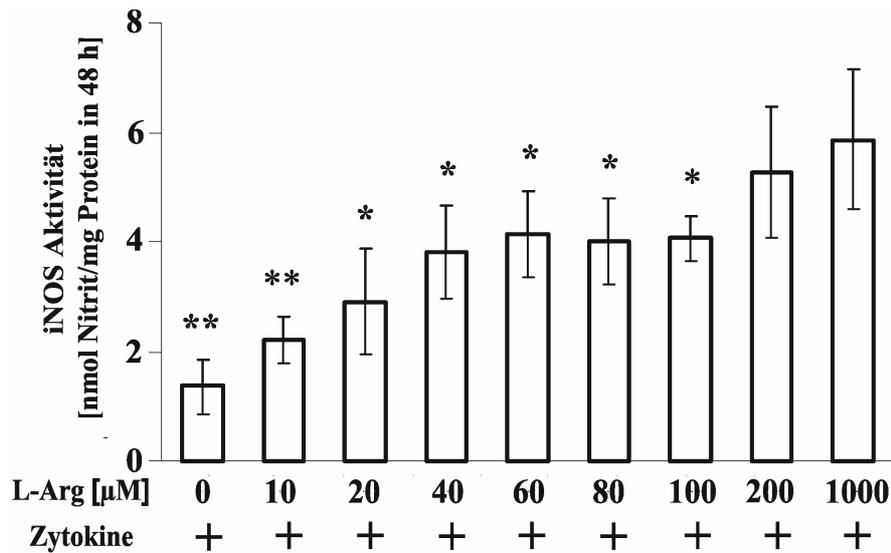


Abb. 1.7 iNOS Aktivität in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration
 Die NO-Konzentration wurde indirekt bestimmt, indem Nitrit mit dem Griess-Assay in den Überständen bestimmt wurde. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 µM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

1.8 Physiologische Mengen Stickstoffmonoxid haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von eIF2 α

Da NO selbst Stress für Zellen sein kann, wurde untersucht, ob exogene NO-Donoren oder endogenes NO den Phosphorylierungsstatus von eIF2 α verändern. Besonderes Augenmerk lag hier auf der endogenen NO-Synthese und der Frage, ob diese die Translation über eIF2 α beeinflusst. Für die Versuche wurden zwei NO-Donoren verwendet.

DETA/NO, ein Donor mit langsamer Freisetzungskinetik [88], führte nur, wenn es über einen langen Zeitraum (24 Stunden) im Zellkulturmedium vorhanden war und in der höheren der beiden getesteten Konzentrationen zu einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus von eIF2 α (Abb. 1.8 A und B). Hier war der nitrosative Stress so hoch, dass die Zellen apoptotisch wurden (46,9% bei 500 µM DETA/NO / 24 h vs. 6,3% bei 250 µM DETA/NO / 24 h, Daten nicht gezeigt). Der Zelltod wurde fluoreszenzmikroskopisch mit den Farbstoffen Hoechst 33342 für den Apoptosenachweis und Propidiumiodid für den Nachweis der Nekrose überprüft.

Der Kurzzeit-NO-Donor SNOC mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten [108] resultierte bei Verwendung einer Konzentration von 250 µM oder mehr in einer Phosphorylierung von eIF2 α . Diese Konzentrationen waren wiederum so hoch, dass sie zur Apoptose der Keratinozyten führten (Daten nicht gezeigt) (Abb. 1.8 C). Endogen von der iNOS synthetisiertes NO war auch über einen Zeitraum von 72 Stunden nach der Zytokinaktivierung der Zellen nicht in der Lage, den Phosphorylierungsstatus von eIF2 α zu

verändern (Abb. 1.8 D). Die Aktivierung der Zellen wurde überprüft, indem die Nitritkonzentration im Kulturmedium bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

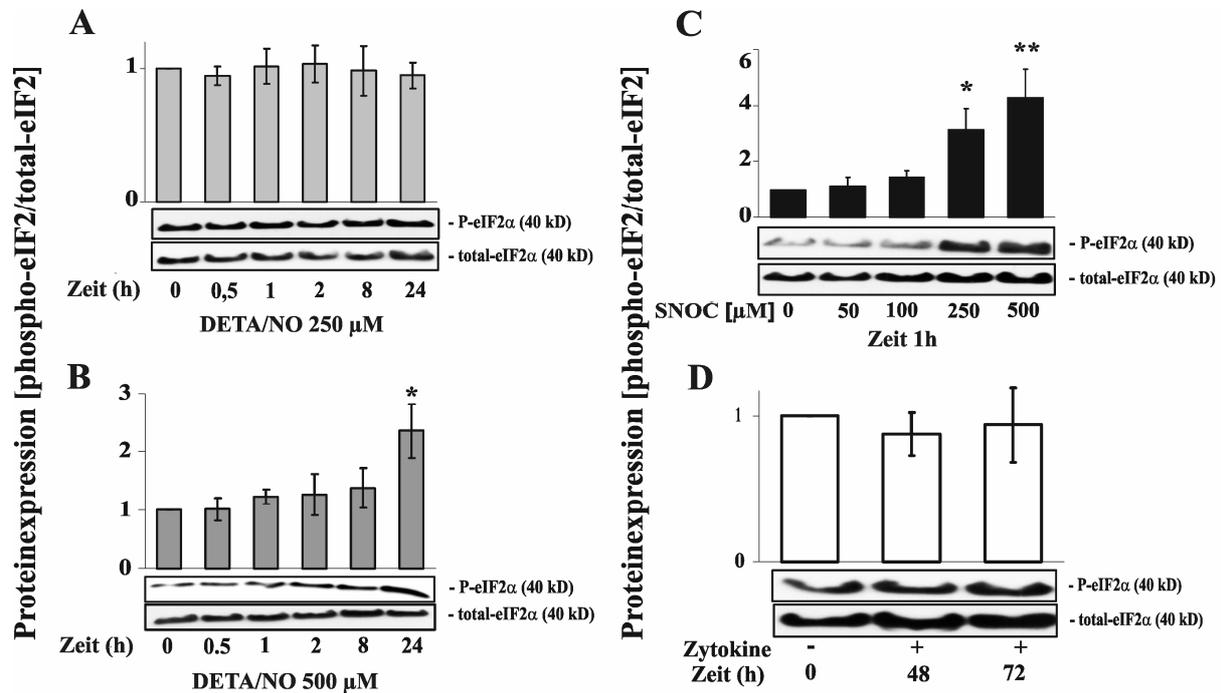


Abb. 1.8 Veränderung des Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors eIF2α in Abhängigkeit von exogenem und endogenem NO

Die Proteine wurden mit einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern für den Phosphorylierungsstatus von eIF2α in Zelllysaten nachgewiesen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit unbehandelten Zellen. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass NO unter physiologischen Bedingungen keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2α hat. Nur nitrosativer Stress, hervorgerufen durch exogene NO-Donoren, führte zu einer verstärkten Phosphorylierung, die gleichzeitig mit einer stark erhöhten Zahl an apoptotischen Zellen auftrat.

2. Einfluss der L-Argininverfügbarkeit auf das Expressionsmuster von IL-1 α

Eine wichtige NF- κ B regulierte Gruppe von Genen sind die proinflammatorischen Zytokine, die eine entscheidende Rolle in der Immunantwort spielen. Ob die erhöhte NF- κ B DNA-Bindungsaktivität und die Phosphorylierung von eIF2 α auch die Expression dieser Gene auf mRNA- und Proteinebene beeinflusst, wurde am Beispiel von IL-1 α untersucht.

IL-1 α ist ein potentes Zytokin, das von einem distinkten Gen transkribiert wird. Auf Aminosäureebene weist es eine 25%ige Homologie mit IL-1 β auf. Beide Proteine binden auf der Zelloberfläche an dieselben Rezeptoren, werden zunächst aber als biologisch inaktive Vorläufer synthetisiert. Die Vorläufer müssen von dem *interleukin 1 β -converting enzyme* (ICE) gespalten werden, um ihre biologische Aktivität zu gewinnen. Zytokine sind besonders interessant, da eine Veränderung ihrer Expressionsmuster weit reichende Konsequenzen sowohl für die direkt betroffene als auch für andere Zellen hätte, da sie unter proinflammatorischen Bedingungen biologisch aktiv sind.

2.1 Die IL-1 α mRNA-Expression wird nicht durch die L-Argininverfügbarkeit verändert

Weder in An- noch in Abwesenheit von Zytokinen wurde die IL-1 α mRNA-Synthese durch eine verminderte L-Argininverfügbarkeit verändert (Abb. 2.1). Eine starke Induktion der IL-1 α mRNA gegenüber unbehandelten Proben wurde durch die Aktivierung der Zellen mit Zytokinen erreicht (43 \pm 31 vs. 1 [1000 μ M L-Arginin aktiviert vs. 1000 μ M L-Arginin resident]). Dieser Anstieg der IL-1 α mRNA-Expression diente als Kontrolle für die korrekte Zytokinaktivierung der Zellen.

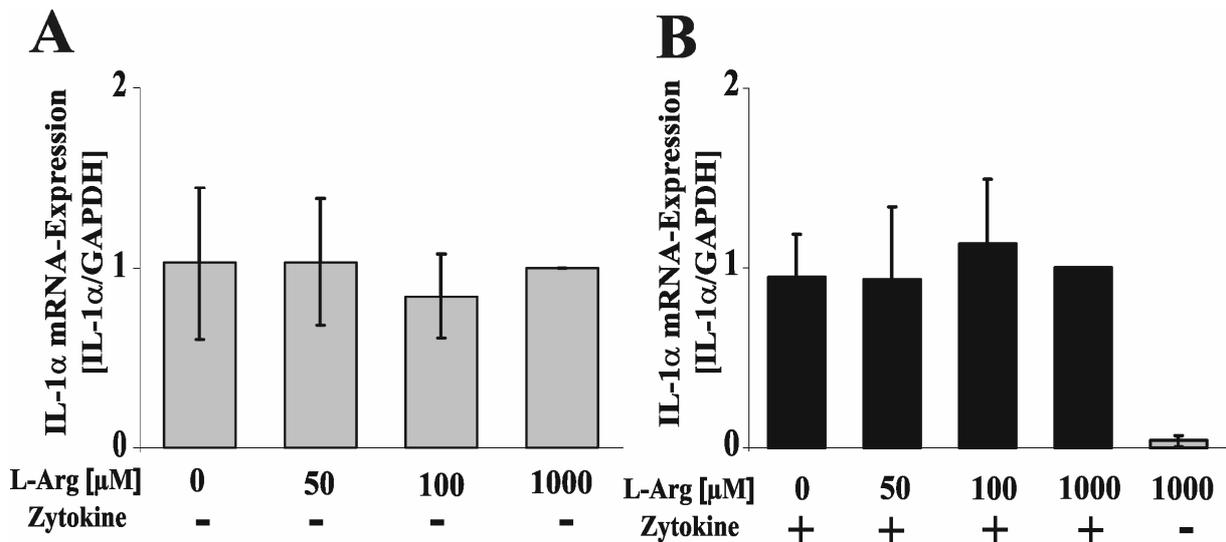


Abb. 2.1 IL-1 α mRNA-Expression in Abhängigkeit von der L-Argininverfügbarkeit

Die mRNA wurde aus Zellkulturproben isoliert, revers transkribiert und quantitativ mit spezifischen *real-time* PCR Primern für murines IL-1 α (172 bp) und GAPDH (223 bp) amplifiziert. Die GAPDH wurde als Haushaltsgen zur Normierung der Proben eingesetzt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 μM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

2.2 Die Konzentration von biologisch aktivem IL-1 α wird in Keratinozyten nicht durch die L-Argininverfügbarkeit beeinflusst

Die Konzentration an biologisch aktivem IL-1 α wurde über einen spezifischen ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) in Zelllysaten bestimmt. Besonders der Anteil eines aktivierten Zytokins ist hinsichtlich der Frage, ob die L-Argininverfügbarkeit Auswirkungen auf die inflammatorische Immunantwort der Keratinozyten hat, interessant. Die Konzentration an IL-1 α wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Zytokinen ermittelt.

Tab. 2 IL-1 α bioaktives Protein wurde in Zelllysaten 24 Stunden nach der Behandlung mit Zytokinen oder in Abwesenheit von Zytokinen bestimmt

L-Arginin [μM]	Biologisch aktives IL-1 α [pg/ml]	
	resident	zytokinaktiviert
0	6,8 \pm 5,5	274 \pm 17
50	6,3 \pm 4,6	266 \pm 22
100	5,9 \pm 4,1	261 \pm 22
1000	7,5 \pm 6,1	248 \pm 27

In Abwesenheit von Zytokinen konnten nur wenige pg/ml IL-1 α nachgewiesen werden. In zytokinaktivierten Zellen stieg die Konzentration des biologisch aktiven IL-1 α in eben dem Maße an (Tab. IV. 2) wie vorher die IL-1 α mRNA-Expression. Es war ein leichter Anstieg der Konzentration der aktiven Form des Zytokins IL-1 α in Abhängigkeit von L-Arginin zu

erkennen (274 ± 17 pg/ml [$0 \mu\text{M}$ L-Arginin] vs. 248 ± 27 [$1000 \mu\text{M}$ L-Arginin]), der jedoch nicht signifikant war.

3. Effekte der extrazellulären L-Argininkonzentration auf Zellproliferation und Zellzyklus

Nachdem in den vorangegangenen Teilen der Einfluss des L-Arginins auf die Expressionsmuster der iNOS und des IL-1 α gezeigt wurde, sollte in diesem Teil die Auswirkung von limitierter L-Argininverfügbarkeit auf den Zellzyklus untersucht werden. Zum einen bedeutet ein Mangel an der Aminosäure L-Arginin einen gewissen Stress für die Keratinozyten, der sich in der Phosphorylierung von eIF2 α manifestiert und Auswirkungen auf die Transkription und Translation einiger Gene (iNOS/NF- κ B) hat, zum anderen braucht jede Zelle für ihr Wachstum L-Arginin zur Polyaminsynthese, die elementare Bausteine der Zelle bereitstellt [109]. Daher ist z.B. der L-Argininbedarf eines Tumors besonders groß. Deswegen ist es sinnvoll, die Proliferation und den Zellzyklus der Zellen unter verschiedenen L-Argininkonzentrationen zu untersuchen.

3.1 Bestimmung der Zellzahl unter verschiedenen L-Argininkonzentrationen und Vorbehandlungen

Die L-Argininverarmung führt dosisunabhängig zu einem proproliferativen Effekt. Zellen, die mit $50 \mu\text{M}$ L-Arginin 48 Stunden präinkubiert wurden, zeigten nach weiteren 48 Stunden bei einer L-Argininkonzentration von $50 \mu\text{M}$ eine $22 \pm 15\%$ höhere Zellzahl. Dieses verstärkte Wachstum war signifikant gegenüber den mit $1000 \mu\text{M}$ L-Arginin kultivierten Zellen erhöht. Noch größer fiel die Zellzahlerhöhung aus, wenn die Zellen mit $1000 \mu\text{M}$ L-Arginin präinkubiert wurden ($1,63 \pm 21$ [$50 \mu\text{M}$ L-Arg] vs. 1 [$1000 \mu\text{M}$ L-Arg]).

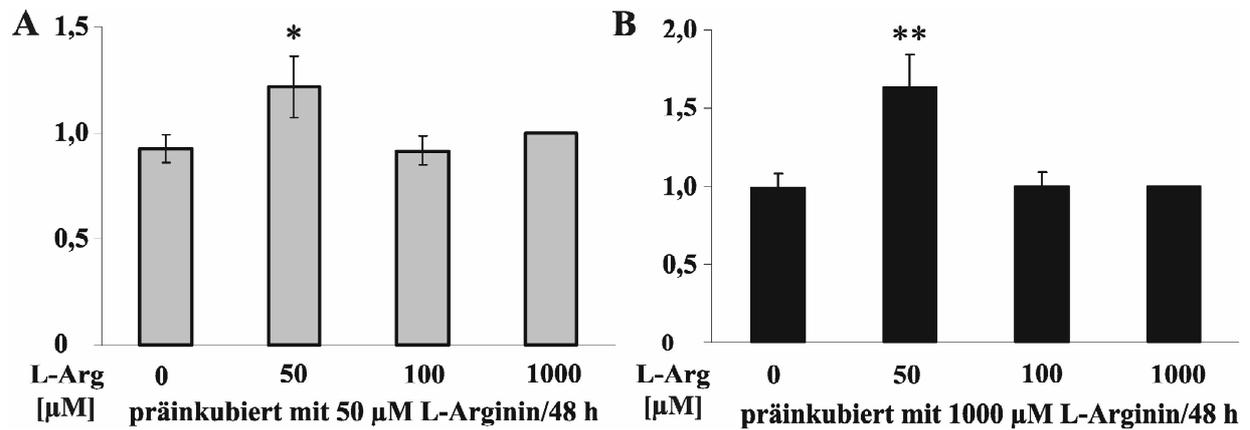


Abb. 3.1 50 µM L-Arginin führen zu verstärktem Zellwachstum

Es wurden 2500 Zellen pro 6-Loch ausgesät und die Zellzahl mit Neutralrot bestimmt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ verglichen mit 1000 µM L-Arginin. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus fünf unabhängigen Experimenten.

3.2 Bestimmung der Zellzyklusphase mit dem Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorting-FACS*)

Nachdem mit Neutralrot eine erhöhte Zellzahl bei einer L-Argininkonzentration von 50 µM festgestellt wurde, wurde nun untersucht, ob das verstärkte Wachstum der Zellen mit einer Verschiebung der Zellzyklusphasen einherging.

Mit Hilfe der FACS-Methode sollte bestimmt werden, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen befanden. Dafür wurden die Zellen wiederum für 48 Stunden mit 1 mM L-Arginin präinkubiert, dann für 48 Stunden mit den verschiedenen L-Argininkonzentrationen kultiviert, trypsinisiert und mit der FACS-Lösung inkubiert. Die Versuche ergaben eine nichtsignifikante Verschiebung der Population in Richtung S1- und G2-Phase, wenn die Zellen mit 50 µM L-Arginin kultiviert wurden.

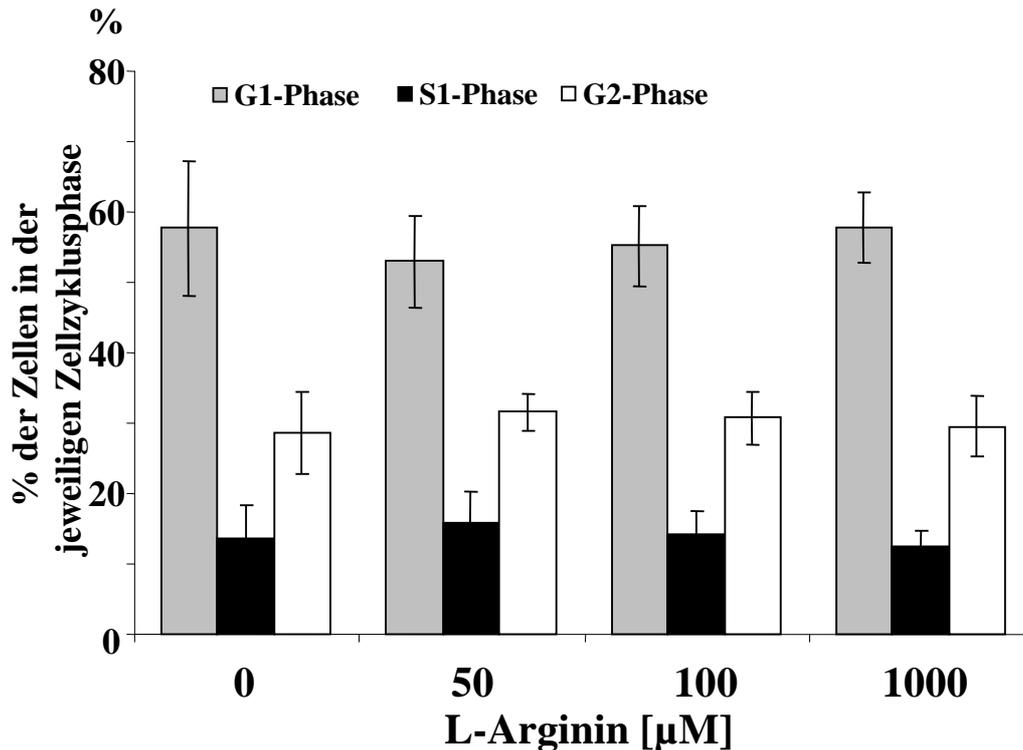


Abb. 3.2 Analyse der Zellzyklusphasen unter diversen L-Argininkonzentrationen
Mit Hilfe eines Durchflusszytometers wurden die Zellpopulationen auf ihren DNA-Gehalt untersucht. Der DNA-Gehalt der Zellen wurde mittels Propidiumiodid-Färbung bestimmt und die Verteilung auf die Zellzyklusphasen mit der Software WinMDI 2.8 analysiert. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus acht unabhängigen Experimenten.

4. Einfluss einer *Mycoplasma hyorhinis* Infektion auf den L-Argininmetabolismus in murinen und humanen Zellen

Neben dem Modell einer Entzündung sollte ein zweites Szenario untersucht werden, bei dem die Immunantwort der Keratinozyten stimuliert wird und zu einer intrazellulären L-Argininverarmung führen kann. Hier sollten zwei Fragestellungen untersucht werden: 1. Wie beeinflusst eine parasitäre Infektion den L-Argininmetabolismus? 2. Gibt es Unterschiede in der Regulation der Expression der iNOS auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene zwischen humanen und murinen Zellen unter infektiösen sowie gesunden und entzündlichen Bedingungen?

4.1 Die *M. hyorhinis* Infektion induziert die iNOS mRNA-Expression und verstärkt die zytokininduzierte NO-Synthese in murinen Keratinozyten

Die Auswirkungen einer parasitären Mycoplasmeninfektion auf die Regulation von iNOS und Arginase hinsichtlich der Proteinexpression und der Enzymaktivität wurden in diesem Teil

der Arbeit bestimmt. Die Infektion von murinen Keratinozyten mit *M. hyorhinis* in Abwesenheit von Zytokinen führte nach 24 Stunden zu einer *de novo* Expression der iNOS mRNA (Abb. 4.1). Die Expressionsstärke der iNOS mRNA, die durch *M. hyorhinis* induziert wurde, war mit der durch proinflammatorische T_H1-Zytokine induzierten mRNA-Expression vergleichbar (Abb. 4.1), wobei die Zellen durch die Zytokine maximal stimuliert waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zytokininduzierte iNOS mRNA-Synthese durch die Infektion mit *M. hyorhinis* weiter gesteigert werden konnte (Abb. 4.1). Als spezifischer iNOS-Inhibitor wurde NIO benutzt, mit dem ausgeschlossen werden konnte, dass NO selbst die mRNA-Expression der iNOS beeinflusste (Abb. 4.1). So war es möglich nachzuweisen, dass *M. hyorhinis* in Abwesenheit von Zytokinen in der Lage ist, *de novo* iNOS mRNA zu induzieren.

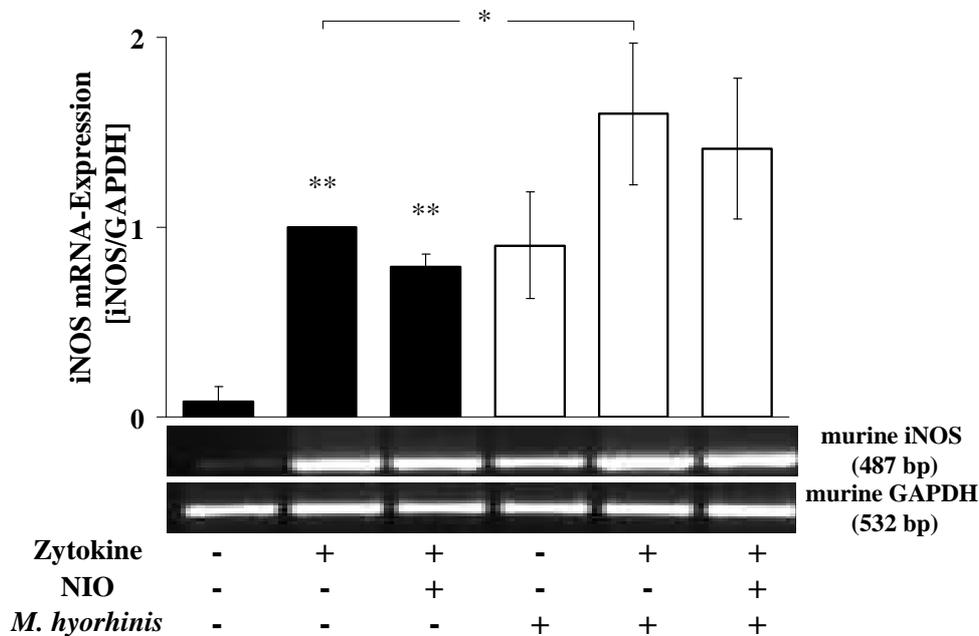


Abb. 4.1 iNOS mRNA-Expression während einer *M. hyorhinis* Infektion

Die mRNA wurde aus Zellkulturproben aufgereinigt, revers transkribiert und mit spezifischen PCR-Primern für die murine iNOS (487 bp) und GAPDH (532 bp) in einer semiquantitativen PCR amplifiziert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Die durch *M. hyorhinis* induzierte iNOS mRNA wurde jedoch nicht in iNOS Protein translatiert (Abb. 4.2), wogegen die zytokininduzierte iNOS mRNA translatiert wurde. Wie die mRNA wurde auch die Proteinsynthese, wenn sie durch Zytokine induziert war, durch die Infektion mit *M. hyorhinis* verstärkt (Abb. 4.2). So findet sich auch auf der Proteinebene der bei der mRNA gefundene synergistische Effekt aus Zytokinaktivierung und Mycoplasmeninfektion wieder. Das von der iNOS synthetisierte NO hatte keinen Einfluss auf die iNOS Proteinexpression (Abb. 4.2).

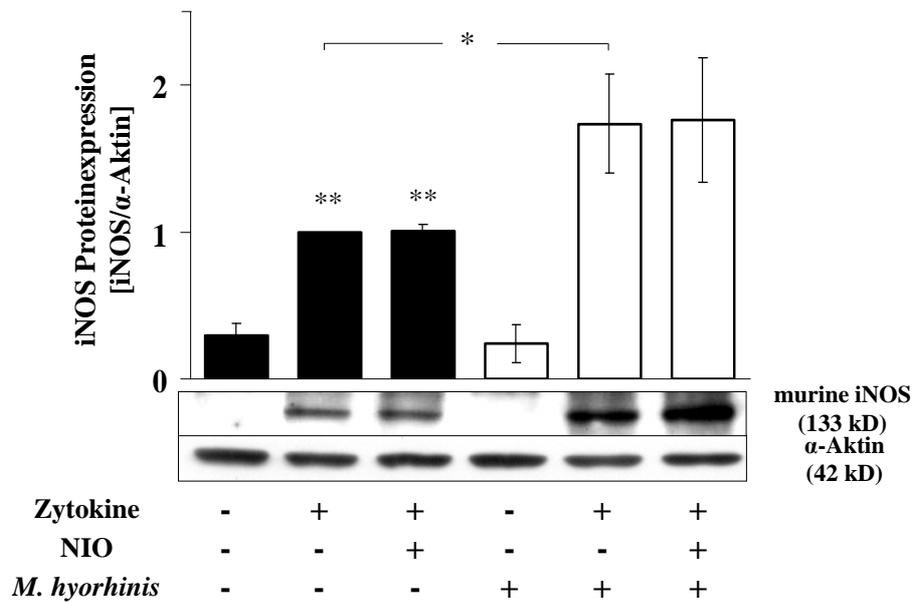


Abbildung 4.2 iNOS Proteinexpression während einer Mycoplasmeninfektion

Die Proteine wurden mittels eines Western Blots mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und densitometrisch quantifiziert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Während in Gegenwart von Zytokinen die iNOS Proteinexpression um das $1,7 \pm 0,3$ -fache gegenüber dem zytokinvermitteltem Effekt in *M. hyorhinis* infizierten Zellen erhöht war, steigerte sich die NO-Synthese um beinahe das dreifache (57 ± 1 vs. 17 ± 5 nmol Nitrit/mg Protein) (Abb. 4.3).

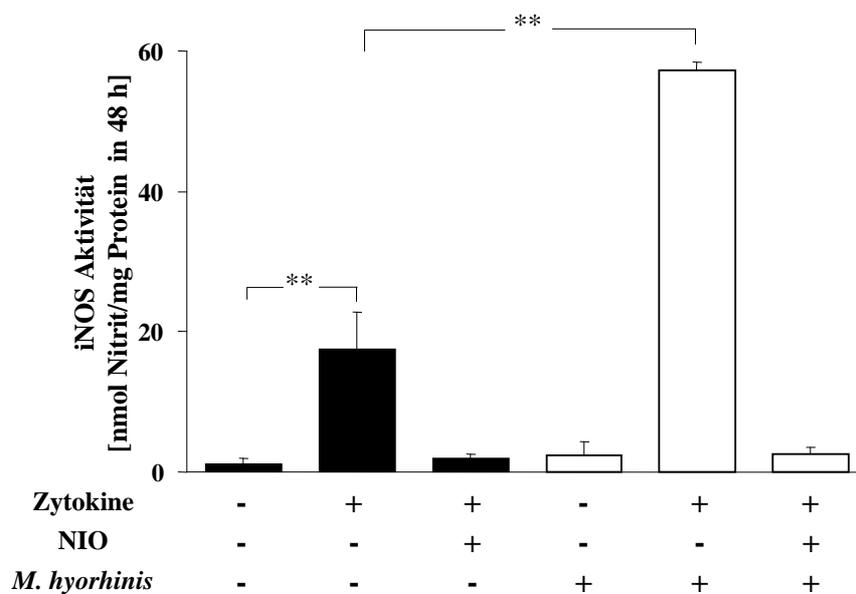


Abbildung 4.3 Einfluss der *M. hyorhinis* Infektion auf die iNOS Aktivität

Die NO-Konzentration wurde indirekt mit einem Griess-Assay bestimmt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

4.2 Eine *M. hyorhina* Infektion erniedrigt die Arginase-1 mRNA-Expression und Aktivität

Da die Arginase mit der iNOS um ihr gemeinsames Substrat L-Arginin konkurriert, limitiert besonders die Arginaseexpression und -aktivität die Verfügbarkeit von L-Arginin für die iNOS. Weil die iNOS Aktivität posttranslational durch die Verfügbarkeit von L-Arginin reguliert wird, wurden die Effekte der *M. hyorhina* Infektion auf die Arginase-1-Expression und -Aktivität in murinen Keratinozyten in An- und Abwesenheit von Zytokinen untersucht. Eine *M. hyorhina* Infektion führte zu einer signifikanten Abnahme der Arginase-1 mRNA-Expression ($67 \pm 12\%$ vs 100% der Kontrolle) (Abb. 4.4), wobei das von der iNOS synthetisierte NO keinen Einfluss auf die Arginase-1 mRNA-Expression hatte (Abb. 3.4). Die zytokinvermittelte Abnahme der Arginase-1 mRNA (Abb. 4.4) deckt sich mit früheren Ergebnissen [4,110]. Dieser Effekt wurde durch die Infektion mit *M. hyorhina* verstärkt (Abb. 4.2).

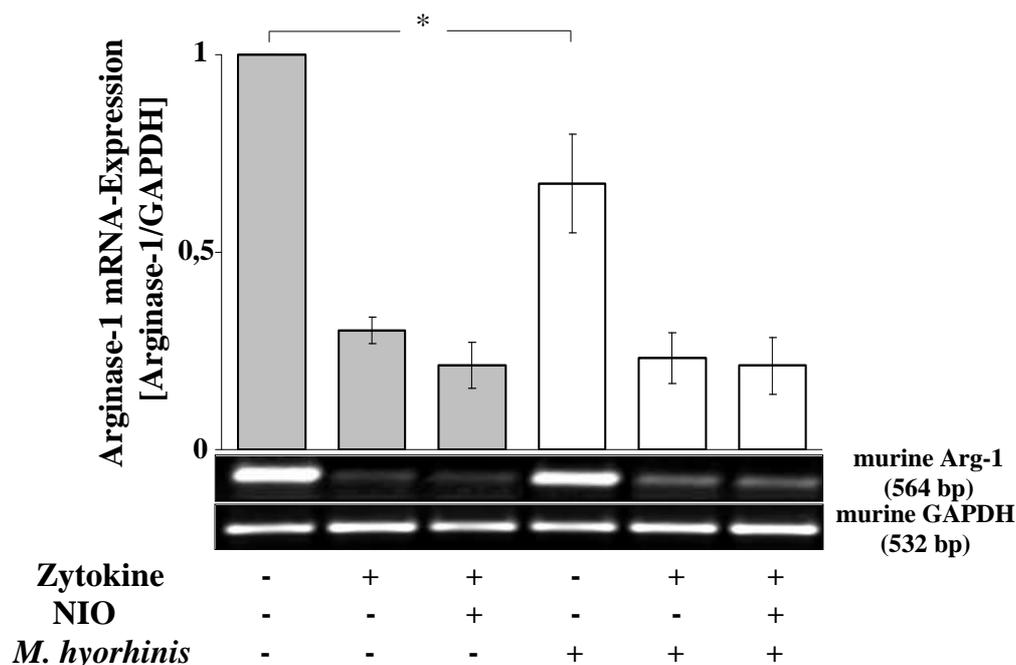


Abb. 4.4 Arginase-1 mRNA-Expression bei einer *M. hyorhina* Infektion

Die mRNA wurde aus Zellkulturproben aufgereinigt, revers transkribiert und mit spezifischen PCR-Primern für die murine Arginase-1 (564 bp) und GAPDH (532 bp) in einer semiquantitativen PCR amplifiziert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Die Arginase-1 Proteinexpression blieb in Gegenwart von *M. hyorhina* oder nach Zytokinaktivierung für 48 Stunden unverändert (Abb. 4.5).

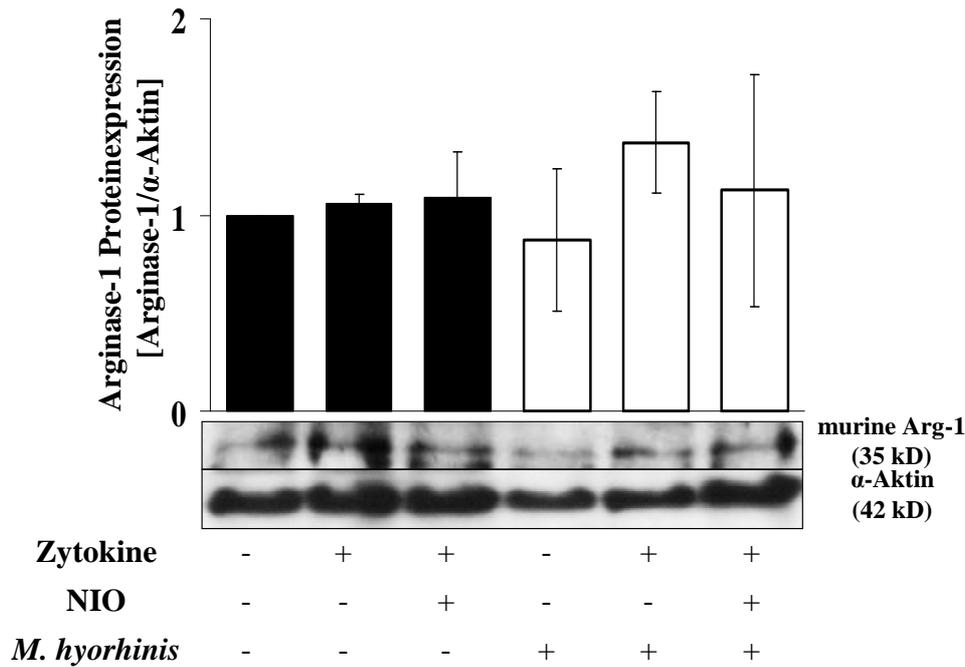


Abb. 4.5 Arginase-1 Proteinexpression während einer *M. hyorhinitis* Infektion

Die Proteine wurden mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zu den Effekten, die die Infektion mit *M. hyorhinitis* auf die Proteinexpression hatte, senkte sie die Aktivität der Arginase signifikant ($7,5 \pm 0,2$ vs. $10,2 \pm 1,2$ $\mu\text{mol Urea/mg Protein und Stunde}$) (Abb. 4.6). Kontrollexperimente mit einer iNOS Inhibition durch NIO zeigten, dass NO keinen Einfluss auf die Arginaseaktivität hat (Abb. 4.6).

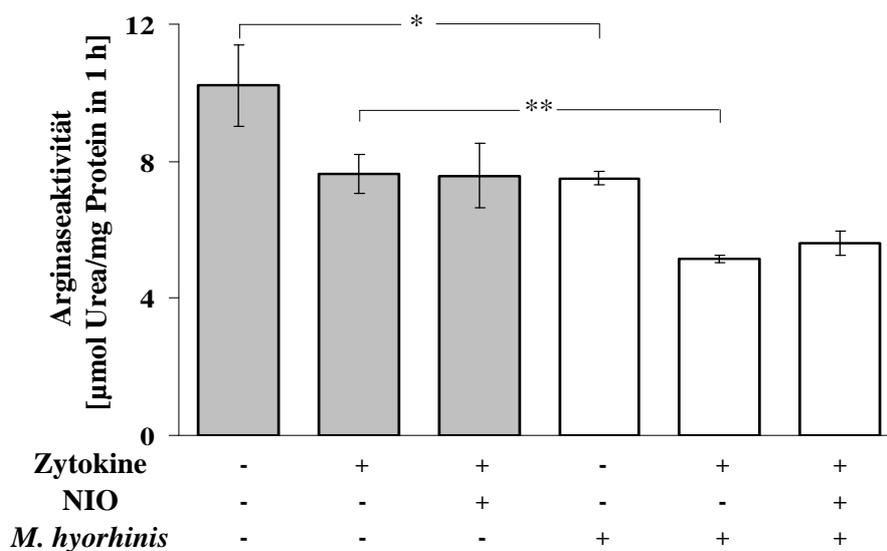


Abb. 4.6 Einfluss einer *M. hyorhinitis* Infektion auf die Arginase-1-Aktivität

Die Arginaseaktivität wurde in Zellysaten bestimmt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

4.3 Die NF- κ B-Aktivität und -DNA-Bindungsaktivität wird durch die Infektion mit *M. hyorhinis* gesteigert

Um die Phänomene der iNOS mRNA-Induktion und Arginase-1 mRNA-Abnahme zu erklären, wurde die nukleäre Translokation des wichtigsten Transkriptionsfaktors für proinflammatorische Gene, NF- κ B, und die Aktivität eines NF- κ B-*response-elements* untersucht.

Für diese Experimente wurde eine stabil transfizierte Zelle benutzt, die ein Plasmid mit einem NF- κ B-*response-element* vor einem Luziferase-Reportergen trägt. Eine *M. hyorhinis* Infektion induzierte NF- κ B-Aktivität in Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen. In Kombination mit Zytokinen resultierte eine verstärkte NF- κ B-Aktivität verglichen mit der in Anwesenheit von Zytokinen detektierten Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Eine Translokation von NF- κ B in den Nukleus und daraus folgend eine verstärkte NF- κ B DNA-Bindungsaktivität war eine Folge einer *M. hyorhinis* Infektion (Abb. 3.7), was mit Hilfe von Gelshift-Experimenten gezeigt werden konnte. Die Zytokinaktivierung führte zu einer ebenso hohen NF- κ B DNA-Bindungsaktivität wie die Infektion mit *M. hyorhinis* (Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu führte die Zytokinaktivierung kombiniert mit einer *M. hyorhinis* Infektion zu einer deutlich gesteigerten DNA-Bindungsaktivität (Abb.4.7); hier war die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität $4,4 \pm 0,8$ -fach höher als in unbehandelten Zellen.

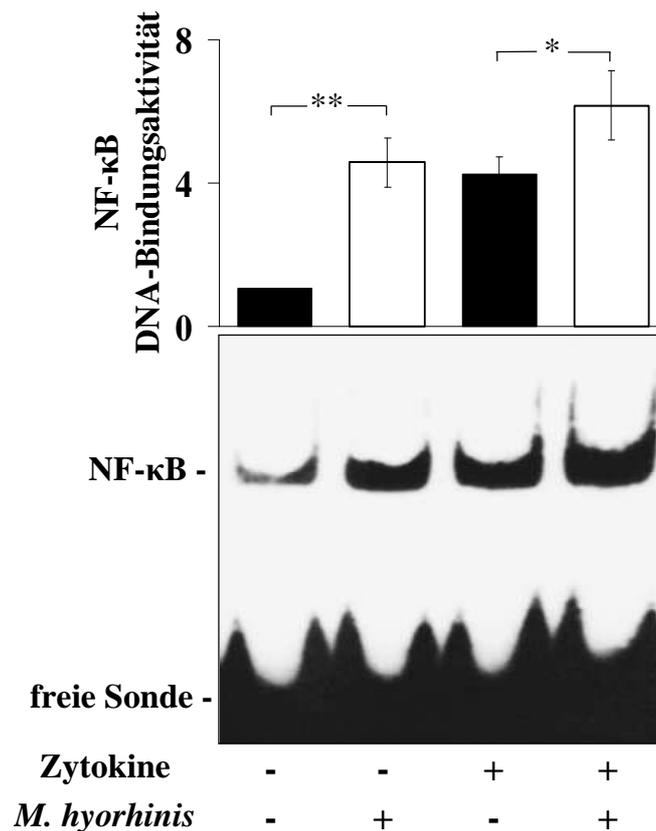


Abbildung 4.7 NF-κB DNA-Bindeaktivität bei einer *M. hyorhinis* Infektion

Die nukleären Extrakte wurden eine Stunde nach der Behandlung der Keratinozyten mit Zytokinen oder nach der Infektion mit *M. hyorhinis* isoliert und der Proteingehalt bestimmt. Die DNA-Bindeaktivität wurde mit *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) gezeigt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Differentielle Regulation der murinen und humanen iNOS

Um zu untersuchen, ob auch die Regulation der humanen iNOS durch eine *M. hyorhinis* Infektion verändert wird, wurden ausgewählte Experimente mit den humanen Zelllinien A549/8 und DLD-1 durchgeführt. A549/8 Zellen sind Lungenepithel-Karzinomzellen, die hier meist als Träger der Plasmide benutzt wurden, bei denen aber auch ohne transfiziertes Plasmid die Synthese des iNOS Proteins induzierbar ist. DLD-1 Zellen sind Colonadenokarzinomzellen, die eine Deregulation von I-κB, dem Inhibitor von NF-κB, aufweisen, welche zu einer konstitutiven, jedoch steigerbaren, iNOS Proteinexpression führt. Um zu kontrollieren, ob *M. hyorhinis* einen Effekt auf die iNOS Promotoraktivität hat, wurden A549/8 Zellen, die stabil mit einem 16-kb Fragment des humanen iNOS Promotors transfiziert waren, infiziert. Dieses Fragment befindet sich vor einem Luziferase-Reportergen [111]. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [103] wurde durch die

Zytokinaktivierung eine sechsfache Erhöhung der iNOS Promotoraktivität induziert. Die Infektion mit Mycoplasmen führte zu einer signifikanten Erhöhung der iNOS Promotoraktivität ($1,6 \pm 0,2$ vs. 1) in Abwesenheit von Zytokinen. In aktivierten Zellen war die Steigerung der Promotoraktivität nach der Infektion mit *M. hyorhina* nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit murinen Zellen nahm in Abwesenheit von Zytokinen in *M. hyorhina* infizierten DLD-1 Zellen die iNOS mRNA-Expression nicht signifikant zu. In A549/8 Zellen konnte keine Veränderung der iNOS mRNA-Expression beobachtet werden. Weiterhin bewirkte eine *M. hyorhina* Infektion in Anwesenheit von Zytokinen nur eine moderate Steigerung der iNOS mRNA-Expression (Abb. 4.8).

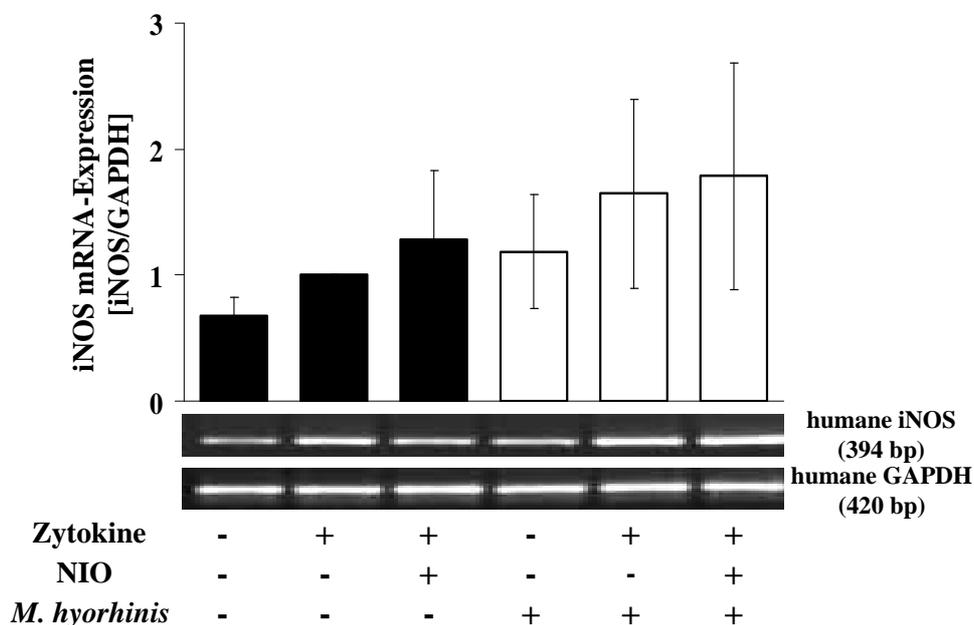


Abb. 4.8 iNOS mRNA-Expression während einer *M.h.*-Infektion

Die mRNA wurde aus Zellkulturproben aufgereinigt, revers transkribiert und mit spezifischen PCR-Primern für die humane iNOS (394 bp) und GAPDH (420 bp) in einer semiquantitativen PCR amplifiziert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Versuche mit humanen Zellen mit dem iNOS-Inhibitor NIO bestätigen das Ergebnis aus den murinen Zellen, dass iNOS-abhängig synthetisiertes NO keine Auswirkungen auf die Expression der iNOS mRNA hat (Abb. 4.8).

Obwohl die iNOS mRNA-Expression durch eine Infektion mit *M. hyorhina* kaum gesteigert wurde, erhöhte sich die NO-Synthese signifikant in Gegenwart von Zytokinen. In deren Abwesenheit konnte keine verstärkte Enzymaktivität durch eine *M. hyorhina* Infektion nachgewiesen werden (Abb. 4.9).

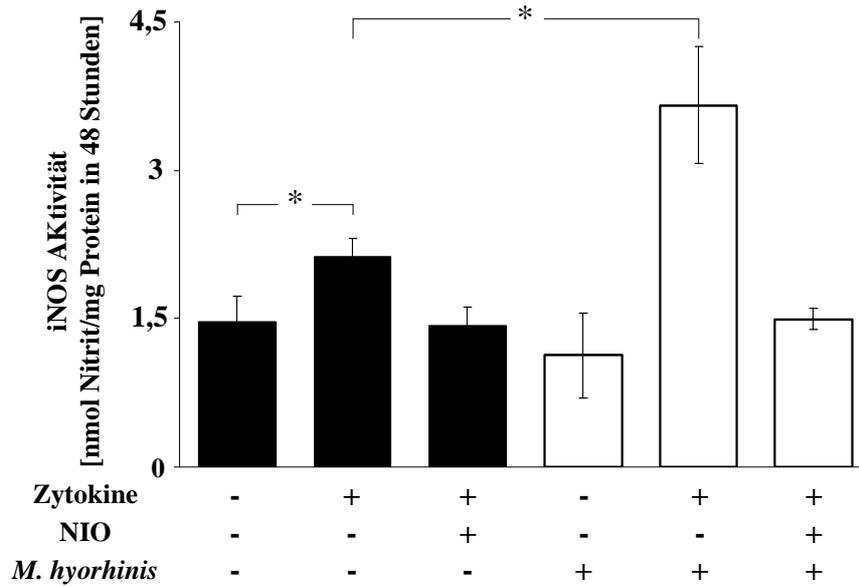


Abb. 4.9 iNOS Aktivität in humanen Zellen

Die Nitritkonzentration wurde indirekt mit einem Griess-Assay bestimmt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten.

Um die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären, wurden die Konsequenzen der *M. hyorhinitis* Infektion auf die Arginase-1 und die kationische Aminosäuretransporter-2 (CAT-2) mRNA-Expression in humanen Zellen untersucht. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der intrazellulären L-Argininverfügbarkeit. Sowohl in DLD-1 als auch in A549/8 Zellen wird keine Arginase-1 mRNA exprimiert, jedoch der Transporter CAT-2 mRNA, der eine hohe Transportkapazität besitzt. Die CAT-2 mRNA-Expression nahm durch die Infektion von *M. hyorhinitis* zu, was zu einer gesteigerten intrazellulären L-Argininverfügbarkeit für die iNOS-abhängige NO-Synthese führte (Daten nicht gezeigt).

V. Diskussion

1. Eine verminderte L-Argininverfügbarkeit erhöht die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität und beeinflusst die Regulation der iNOS Expression

Eine lokal verminderte L-Argininverfügbarkeit kann die Folge einer erniedrigten extrazellulären Konzentration oder eines erhöhten Umsatzes dieser Aminosäure sein; beides kann bei einem inflammatorischen Prozess mit stark exprimierter iNOS und/oder Arginase vorkommen. In dieser Arbeit wurde ein Zellmodell unter Verwendung muriner Keratinozyten etabliert, das es ermöglicht, die Folgen einer L-Argininverarmung zell- und molekularbiologisch zu analysieren. Da die Keratinozyten in modifiziertem RPMI 1640 Medium mit nur 50 μ M L-Arginin kultiviert werden, ist es möglich, durch die Regulierung der extrazellulären L-Argininkonzentration den intrazellulären L-Argininpool einzustellen (Tab. IV.1). Unter Standardzellkulturbedingungen steht den Zellen eine L-Argininkonzentration von 0,8-1,1 mM zur Verfügung, was gegenüber dem L-Argininplasmaspiegel einer supraphysiologischen Konzentration entspricht. Physiologisch liegt im Plasma eine wesentlich niedrigere L-Argininkonzentration von ca. 100 μ M vor, welche unter pathophysiologischen Bedingungen auf 50 μ M sinken kann (Tab. V. 1).

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Zellsystem wurden Untersuchungen mit dem Fokus auf der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dem iNOS Expressionsmuster vorgenommen. So konnte Einsicht in L-argininabhängige regulatorische Mechanismen sowohl unter physiologischen und pathophysiologischen L-Argininkonzentrationen als auch unter nicht- und proinflammatorischen Bedingungen gewonnen werden. Bisher wurden noch keine regulatorischen Effekte einer veränderten L-Argininkonzentration auf die iNOS mRNA-Expression beschrieben. In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass sowohl unter physiologischen als auch unter entzündlichen Bedingungen die iNOS mRNA-Expression signifikant ansteigt, nachdem L-Arginin depletiert wurde (Abb. IV 1.1; 1.2). Unter inflammatorischen Konditionen fiel der Anstieg der iNOS mRNA-Expression zwischen einer L-Arginindepletion und den normalen Kulturbedingungen besonders stark aus (20-fach), obwohl die Zellen mit einem Zytokinmix aktiviert wurden, der für die maximale Induktion der mRNA-Synthese ausreichend war.

Die gleichen Experimente wurden unter L-lysindepletierten Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde dem modifizierten Medium 1 mM L-Arginin zugesetzt, dafür enthielt es kein L-Lysin. Die Tatsache, dass die iNOS mRNA-Expression trotz der L-Lysindepletion nicht verändert war, belegt, dass die beobachteten Effekte spezifisch L-argininabhängig sind.

Um aufzuklären, ob die erhöhte iNOS mRNA-Expression durch eine erhöhte mRNA-Stabilität oder eine verstärkte mRNA-Synthese erreicht wird, wurde der Transkriptioninhibitor ActinomycinD eingesetzt. Da unter Verwendung des Inhibitors die iNOS mRNA-Expression nicht in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration anstieg (Abb. IV. 1.21), handelt es sich um eine iNOS mRNA-Neusynthese.

Die *de novo* mRNA-Synthese wird durch den für die Transkription proinflammatorischer Gene zentralen Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert [75]. Die Versuche belegen, dass die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors von der intrazellulären L-Argininkonzentration abhängig ist (Abb. IV. 1.3). Dieser Vorgang läuft unter physiologischen und proinflammatorischen Bedingungen ab, was die verstärkte iNOS mRNA-Expression erklärt. Obwohl die Zytokinkonzentration für eine volle Aktivierung von NF- κ B ausreichend ist, vermag eine limitierte L-Argininverfügbarkeit trotzdem die DNA-Bindung signifikant zu erhöhen. Offensichtlich kommt es hier zu einem synergistischen Effekt von Zytokinaktivierung und L-Arginindepletion. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eindrucksvoll ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären L-Argininkonzentration und der Translokation von NF- κ B in den Kern aufgezeigt werden. Die Aktivierung von NF- κ B kann *in vivo* eine wichtige Rolle für die Progression von Entzündungen spielen. Da der Transkriptionsfaktor die Expression vieler T_H1-Zytokine und proinflammatorischer Gene initiiert, würde seine Aktivierung den Übergang des Entzündungsprozesses in die T_H2-Phase verzögern, was zu verlangsamer Heilung führen würde. Es konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Aminosäure L-Arginin in der Lage ist, den Verlauf einer Entzündung oder Wundheilung zu modulieren.

Nachdem bis vor kurzem angenommen wurde, dass die induzierbare Form der NO-Synthasen hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird [112], wurden kürzlich auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen beschrieben [94].

Auf Proteinebene stellte sich heraus, dass die in Abwesenheit von Zytokinen induzierte mRNA-Expression insuffizient ist, um eine nachweisbare iNOS Proteinexpression einzuleiten (Abb. IV. 1.4). In Anwesenheit von Zytokinen nahm die iNOS Proteinexpression parallel mit der reduzierten L-Argininverfügbarkeit ab (Abb. IV. 1.5). Die Proteinexpression in Abwesenheit von L-Arginin beträgt ca. 30% der unter supraphysiologischen Bedingungen maximal synthetisierten Proteinmenge. Eine verminderte iNOS Proteinexpression deckt sich mit den Ergebnissen von Lee et al. 2003 [94], die diesen Effekt auch in Astrozyten zeigen konnten, aber keine Daten die iNOS mRNA-Expression betreffend vorgelegt haben.

Zusammen mit der verminderten iNOS Proteinsynthese sank auch die iNOS Aktivität bei niedrigen L-Argininkonzentrationen signifikant oder war aufgrund eines Substratmangels nicht mehr vorhanden (Abb. IV. 1.7). Eine geringe Konzentration an Nitrit ließ sich dennoch bei einer L-Arginindepletion nachweisen. Diese Menge an Nitrit wurde allerdings durch Zugabe des iNOS-Inhibitors NIO nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), was den Schluss zulässt, dass die zugrunde liegende NO-Synthese von der in Keratinozyten exprimierten nNOS herrührt oder nicht inhibierbar ist. Eine weitere Quelle für NO in Zellkulturen können die Kulturgefäße sein. Es ist nachgewiesen worden, dass der Kunststoff Nitrit in das Medium abgibt, was zu Konzentrationen bis 500 nM Nitrit im Zellkulturüberstand führen kann (persönliche Beobachtung P. Kleinbongard, Medizinische Klinik I - Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Aachen). Als alleinige Ursache kann dies in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen jedoch ausgeschlossen werden, da eine Nitritkonzentration von 1 μM nachgewiesen werden konnte. Bemerkenswert ist, dass eine detektierbare Menge an iNOS Protein gebildet wird, obwohl kein detektierbares Substrat ($< 10 \mu\text{M}$) für das Enzym vorhanden ist (Tab. IV. 1). In diesem Fall wird das Elektron nicht auf die Guanidinogruppe des L-Arginins übertragen, sondern auf molekularen Sauerstoff [113], was die Bildung eines Superoxidanions zur Folge hat. Bei den konstitutiven NOS-Isoformen ist diese gestörte Elektronenübertragungsreaktion als Entkopplung bekannt und hauptsächlich abhängig von dem Kofaktor BH_4 [114]. Im Gegensatz dazu gibt es für die iNOS nur eine Publikation, die die iNOS-abhängige Generierung von O_2^- *in vitro* nachweist. Da jedoch das iNOS Enzym, sofern es vorhanden ist, posttranslationell durch Kofaktoren nicht reguliert wird, läuft die Übertragungsreaktion in Abwesenheit des Substrats L-Arginin ab und generiert dabei O_2^- [113]. Eine Folge ist die Entstehung sekundärer radikaler Sauerstoffspezies.

Der zweite wichtige Grund, warum ein L-Argininmangel gerade in Heilungsprozessen gravierende Folgen hat, ist die limitierte oder fehlende NO-Synthese. Während der Heilungsphase kommt es zur Koexpression der iNOS und der Arginase. Besonders bei einer beeinträchtigten Wundheilung ist dieses Verhältnis oft zugunsten der Arginase dereguliert [61,115]. Da NO aufgrund seiner mannigfachen regulatorischen Eigenschaften gerade in Bezug auf Genregulation und Proliferation ein unabdingbares Signalmolekül in der Wundheilung und während einer Entzündungsreaktion ist [17,27,108,116], hat eine veränderte NO-Konzentration unter Umständen verheerende Auswirkungen auf den Verlauf der Immunantwort und das Abklingen der $\text{T}_\text{H}1$ -Phase [109]. Der durch die Deregulation hervorgerufene Substratmangel hat zur Folge, dass die Elektronenübertragungsreaktion auf

molekularen Sauerstoff stattfinden kann, so dass ein protektives Enzym durch die wahrscheinliche Entkopplung ein schädliches Produkt hervorbringt.

1.1 Die Regulation der iNOS Translation

Eine bekannte Folge von Aminosäureverarmung ist die Phosphorylierung der Untereinheit eIF2 α des Translationsinitiationsfaktors eIF2 [96,98,117]. Die Phosphorylierung dieser Untereinheit bewirkt, dass die gesamte zelluläre Translation blockiert wird [97], was auch die Translation der iNOS mRNA einschließt. Eine Verminderung der iNOS Proteinexpression kann so durch die L-argininabhängige Phosphorylierung der Translationsinitiationsfaktor-Untereinheit eIF2 α erklärt werden. Die Phosphorylierung steigt in Keratinozyten mit der Verminderung der L-Argininkonzentration an (Abb. IV 1.6). Interessant ist hier, dass unter gesunden Bedingungen eine sprunghafte Änderung des Phosphorylierungsstatus von eIF2 α zwischen 40 und 60 μ M L-Arginin stattfindet. Dieser Konzentrationsbereich entspricht genau der Grenze zwischen einem physiologischen und einem pathophysiologischen Zustand im Plasma. Unter inflammatorischen Bedingungen ist der Grad der Phosphorylierung durchgehend erhöht und steigt kontinuierlich mit der Abnahme der L-Argininkonzentration an. Durch die Phosphorylierung von eIF2 α und die Aktivierung von NF- κ B kann die inverse Regulation der iNOS mRNA und der iNOS Proteinexpression erklärt werden. Auf der einen Seite wird die Transkription durch NF- κ B in Abhängigkeit von der intrazellulären L-Argininkonzentration verstärkt, auf der anderen Seite wird die Translation der iNOS mRNA durch die L-argininabhängige Phosphorylierung von eIF2 α stark erniedrigt.

Um zu untersuchen, ob NO selbst Effekte auf den Phosphorylierungsstatus von eIF2 α hat, wurden Versuche mit diversen NO-Donoren sowie ein Langzeitversuch mit aktivierten Zellen und somit endogen synthetisiertem NO durchgeführt. Einige Veröffentlichungen demonstrieren eine NO-abhängige Phosphorylierung von eIF2 α in verschiedenen Zelltypen mit Ausnahme von Keratinozyten [118-120]. Bei diesem Versuchsdesign wurde der Phosphorylierungsstatus von eIF2 α analysiert und eventuelle zytotoxische Effekte wurden fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Da bei dem endogen synthetisiertem NO keine Änderung der Phosphorylierung auftrat und beide NO-Donoren nur dann zu einer erhöhten Phosphorylierung von eIF2 α führten, wenn nitrosativer Stress vorlag und gleichzeitig die Zahl an apoptotischen Zellen stark anstieg, kann ein Einfluss von NO auf die Phosphorylierung von eIF2 α im vorliegenden Zellsystem ausgeschlossen werden. Das Ergebnis ist eine weitere Bestätigung dafür, dass die gezeigten Effekte einzig L-argininabhängig sind.

2. Einfluss limitierter L-Argininverfügbarkeit auf das Expressionsmuster von IL-1 α

Nachdem gezeigt wurde, dass die limitierte L-Argininverfügbarkeit zentrale Regulationsfaktoren wie NF- κ B und eIF2 α stark beeinflusst, wurde das Expressionsmuster eines weiteren Gens untersucht. Da neben der iNOS die Gruppe der Zytokine sehr wichtige Modulatoren der Immunantwort bzw. des Heilungsprozesses umfasst, deren Expression maßgeblich die korrekten Abläufe während des Entzündungsgeschehens reguliert, wurde ein Gen aus dieser Familie gewählt; dabei handelt es sich um das Zytokin IL-1 α . Die Expression dieses potenten T_H1-Zytokins wurde auf der mRNA- und der Proteinebene analysiert. Erstaunlicherweise wurde die mRNA-Expression von IL- α durch die diversen L-Argininkonzentrationen weder in An- noch in Abwesenheit von Zytokinen nicht verändert (Abb. IV 2.1). Gegenüber den residenten Zellen konnte die IL-1 α mRNA-Expression mit Zytokinen auf das 43-fache gesteigert werden, was belegt, dass eine Induktion grundsätzlich möglich ist.

Ähnliches gilt für die Expression von biologisch aktivem IL-1 α in Zelllysaten. Das Protein war um nahezu den gleichen Faktor wie die mRNA induzierbar, aber es konnten keine L-argininabhängigen Veränderungen der Konzentration an biologisch aktivem IL-1 α in den Lysaten festgestellt werden (Tab. IV 2).

Wie die differentielle Regulation von iNOS und von IL-1 α erreicht wird, bleibt unklar. Kürzlich wurde eine differentielle Genregulation nach kompletter Aminosäurenverarmung in Hefen gezeigt, bei der die mRNA-Expressionslevel zahlreicher Gene verändert waren [121]. Das Interessante ist, dass einige Transkripte verstärkt, andere jedoch schwächer exprimiert werden als in der Kontrolle. Aufgrund der hohen Anzahl (>500) betroffener Gene werden in der Publikation nur ausgewählte genannt, so dass die Zuordnung der regulierenden Transkriptionsfaktoren nicht möglich ist. Eine Beteiligung von NF- κ B kann aber auch auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse angenommen werden.

In dem hier benutzten Zellmodell spielen wahrscheinlich andere zusätzliche Faktoren bei der Transkription und Translation des Zytokins IL-1 α eine Rolle. Erstaunlich ist allerdings, dass das Protein sowohl auf transkriptioneller als auch translationeller Ebene nicht verändert wird, obwohl die Aktivität der jeweils wichtigsten Faktoren NF- κ B und eIF2 α verändert wird. Wahrscheinlich ist die Expression eines Zytokins so streng reguliert, dass die Verfügbarkeit einer einzelnen Aminosäure keinen Einfluss darauf hat. Das wiederum führt dazu, dass die iNOS ihrerseits voll induziert wird, was demonstriert, dass trotz des L-Argininmangels die iNOS mRNA-Synthese initiiert und das iNOS Protein synthetisiert wird, möglicherweise mit einer darauf folgenden Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.

3. *In vivo* Beispiele für eine verminderte L-Argininverfügbarkeit

Diverse Krankheiten zeichnen sich *in vivo* durch erniedrigte L-Argininplasmaspiegel aus (Tab. V. 1). Besonders interessant als *in vivo* Modell für diese Arbeit ist Psoriasis. Diese Erkrankung zeichnet sich durch eine relativ hohe Inzidenz von 2-4% der Bevölkerung in den USA und Europa aus [122]. Patienten, die unter Psoriasis leiden, weisen eine verminderte L-Argininplasmakonzentration auf [92]. Typisch für Psoriasis ist die Hyperproliferation der Keratinozyten in den charakteristischen Plaques. Wahrscheinlich ist dieses verstärkte Wachstum auf eine Dysregulation des iNOS/Arginase-Verhältnisses und der Substratkompetition der beiden Enzyme zurückzuführen. Beide Enzyme werden bei dieser Erkrankung exprimiert, es liegt sogar eine Überexpression der Arginase vor [61]. Aufgrund der K_M -Werte der beiden Enzyme (iNOS- K_M ~ 5 μM /Arginase- K_M 20-80 μM) ist es wahrscheinlich, dass für die iNOS wegen des hohen L-Arginnumsatzes durch die Arginase kaum Substrat zur Verfügung steht. So stellt die Arginase auf der einen Seite viel L-Ornithin, den Vorläufer für die Polyamine her, während die iNOS auf der anderen Seite kaum NO generieren kann, welches in höheren Konzentrationen antiproliferativ wirken würde [27]. Vermutlich kommt es in einer solchen Situation zu einer Superoxidationengeneration, die Zellschädigungen verursachen kann.

Das Phänomen eines gesenkten L-Argininplasmaspiegels tritt auch bei anderen weit verbreiteten Krankheiten wie Asthma und Diabetes auf. Wie es auch für andere chronisch entzündliche Erkrankungen charakteristisch ist, so ist auch bei Asthma die iNOS dauerhaft exprimiert, so dass der dadurch bedingte hohe L-Arginnumsatz zu der niedrigen L-Argininkonzentration im Plasma führt. Anders ist die Situation bei Diabetes, hier liegt eine Überexpression der Arginase-2 vor, die vermutlich zu einem verminderten L-Argininplasmaspiegel führt. Ein weiteres Indiz hierfür ist eine erniedrigte L-Citrullinsynthese, da die iNOS, als Hauptproduzent von L-Citrullin, aufgrund des vorherrschenden Substratmangels nicht voll aktiv sein kann.

Weitere Krankheiten, die mit einer erniedrigten Plasma-L-Argininkonzentration einhergehen, sind in Tab. V.1 zusammengefasst.

Tab. 1: L-Argininplasmaspiegel bei verschiedenen Krankheiten

Krankheit	Gesunde Kontrollen Plasma-L-Arginin [$\mu\text{mol/L}$]	Patienten Plasma-L-Arginin [$\mu\text{mol/L}$]	Fallzahl Kontrolle/Patienten	Quelle
Sichelzellanämie	67 \pm 18	41 \pm 16	36/209	[123]
Atemnotsyndrom	79 \pm 23	33 \pm 11,5	13/17	[57]

Krankheit	Gesunde Kontrollen Plasma-L-Arginin [$\mu\text{mol/L}$]	Patienten Plasma-L-Arginin [$\mu\text{mol/L}$]	Fallzahl Kontrolle/Patienten	Quelle
Asthma	94 \pm 29	45 \pm 22	15/26	[56]
Psoriasis	87 \pm 14	55 \pm 9	10/10	[92]
Koronare Herzkrankheit	125	59	-/-	[124]
Diabetes, erektiler Dysfunktion	Klinische Studie mit stark erhöhter Arginase-2 Expression und signifikant erniedrigter L-Citrullinsynthese			[125]
Krebs	Signifikant erhöhte Arginaseaktivität im Blut		-/80	[126]

Die Häufigkeit des Auftretens der in Tab. V.1 aufgeführten Krankheiten demonstriert, wie wichtig es ist aufzuklären, welche Folgen eine verminderte L-Argininverfügbarkeit für den zellulären Metabolismus und die Genregulation hat.

4. Wie werden die regulatorischen Effekte von L-Arginin vermittelt?

Die Phosphorylierung von eIF2 α unter verschiedenen Stresssituationen wie Aminosäuremangel, ER-Stress und UV-Bestrahlung führt zu einer Blockierung der zellulären Translation [97,127,128]. Dieser Vorgang konnte mit dem in dieser Arbeit etablierten Zellmodell eindrucksvoll für die L-Argininverarmung in Keratinozyten gezeigt werden. Die geltende Meinung, dass die Phosphorylierung des Translationsfaktors die gesamte Translation der Zelle inhibiert, muss allerdings eingeschränkt werden, da in dieser Arbeit bewiesen wurde, dass die Translation von IL-1 α nicht davon betroffen war.

In einer aktuellen Veröffentlichung wird beschrieben, dass I- κ B während der UV-Bestrahlung weniger stabil ist als NF- κ B [127]. Die Publikation stimmt mit einer weiteren überein, in der Deng et al. den I- κ B-Abbau unter ER-Stress untersucht haben [129]. Wenn die Neusynthese von NF- κ B und I- κ B inhibiert wird, NF- κ B jedoch stabiler als I- κ B ist, wird NF- κ B freigesetzt und transloziert als aktiver Transkriptionsfaktor in den Nukleus. Die Publikationen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da hier ebenfalls eine nukleäre Translokation von NF- κ B gezeigt wurde. Eine neue Erkenntnis ist, dass als Stress für die Zellen die stufenweise Depletion der bedingt essentiellen Aminosäure L-Arginin ausreicht. Deutlich konnte die L-argininabhängige erhöhte NF- κ B DNA-Bindungsaktivität sowohl unter physiologischen als auch entzündlichen Bedingungen gezeigt werden (Abb. IV. 1.3). Das im Kern aktive NF- κ B initiiert die Transkription von Stress-Antwortgenen, leider fehlen jedoch

entsprechende mRNA Daten in der Literatur [117]. Weiter wird beschrieben, dass die Depletion der essentiellen Aminosäure L-Leucin als zellulärer Stress vergleichbare Effekte auslöst [128,130]. Im Kontext dieses Befundes stellen die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Effekte einer Verarmung der bedingt essentiellen Aminosäure L-Arginin einen wichtigen Beitrag zum Feld der *argenomics* dar, belegen sie doch eindrucksvoll, dass L-Arginin bezogen auf stressbezogene zelluläre Regulationsmechanismen eine der essentiellen Aminosäure Leucin ähnliche Wirkung und Bedeutung hat.

Da mit sinkender L-Argininkonzentration die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität in Abwesenheit von Zytokinen und sogar in Gegenwart von Zytokinen anstieg, obwohl die Zellen maximal aktiviert waren (Abb. IV 1.3), scheint es sich um einen synergistischen Effekt zu handeln. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass auf der einen Seite das extrazelluläre L-Argininangebot die intrazelluläre Verfügbarkeit reguliert und dass auf der anderen Seite bei einer verminderten L-Argininkonzentration, wie sie z.B. bei einer entzündlichen Hauterkrankung wie Psoriasis auftreten kann, die endogene L-Argininsynthese via *ASL* und *ASS* nicht ausreichend L-Arginin zur Verfügung stellen kann, um die *eIF2 α* Phosphorylierung zu inhibieren (Tab.V.1).

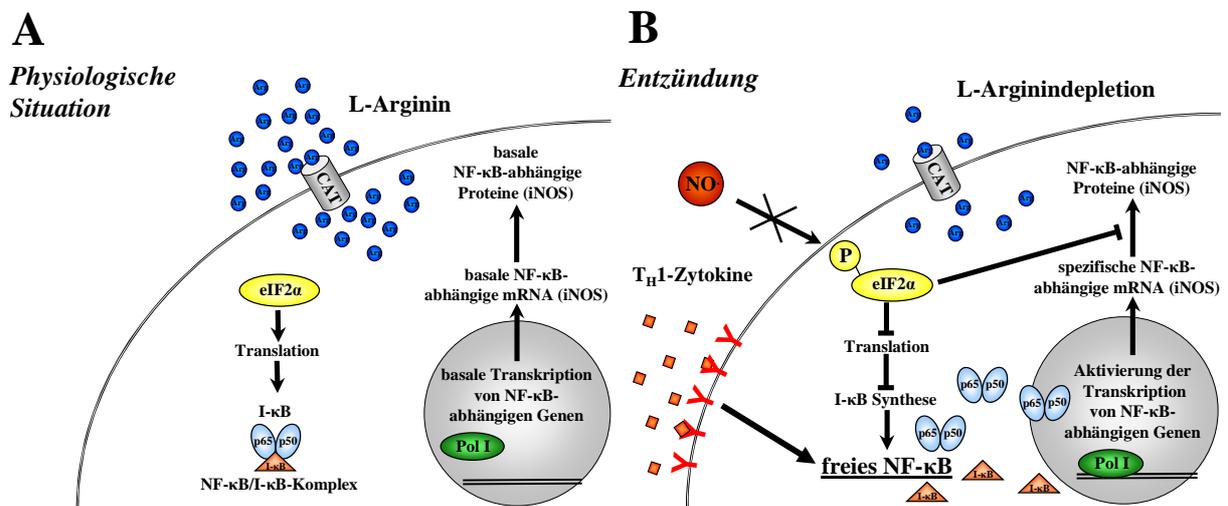


Abb. 1 Schema des Regulationsmechanismus der Genexpression unter physiologischen und unter entzündlichen, mit L-Argininverarmung einhergehenden Bedingungen

A) Bei physiologischen L-Argininkonzentrationen liegt *eIF2 α* dephosphoryliert vor. Somit ist auch der I- κ B/NF- κ B-Komplex stabil und es findet keine Translokation in den Nucleus statt. **B)** Durch die Zytokinaktivierung und die L-Arginindepletion wird ein Zellstress ausgelöst, der zur Phosphorylierung von *eIF2 α* führt. Da I- κ B schneller abgebaut wird als NF- κ B, wird NF- κ B frei und transloziert in den Nucleus. Dort werden jetzt verstärkt NF- κ B abhängige Gene transkribiert und zwar in einem größeren Ausmaß als bei alleiniger Zytokinstimulierung.

5. Kann L-Arginin die Proliferation und den Zellzyklus beeinflussen?

Um eventuelle weitere regulatorische Effekte diverser L-Argininkonzentrationen zu analysieren, wurden unter den verschiedenen Bedingungen zum einen die Zellzahl und zum anderen die Zellzyklusphasen der Kulturen bestimmt.

Die Analysen zu den regulatorischen Effekten der L-Argininverfügbarkeit auf die Proliferation und den Zellzyklus ergaben, dass die intrazelluläre L-Argininkonzentration auch hier eine Rolle spielt. Die Analysen mit verschiedenen L-Argininkonzentrationen belegen bei einer Konzentration von 50 μM L-Arginin eine verstärkte Proliferation der Zellen. Besonders stark fiel dieser Effekt aus, wenn die Keratinozyten mit der Standard-L-Argininkonzentration von 1 mM präinkubiert wurden (Abb. IV. 4.1). Die Erhöhung der Zellzahl ergab sich wahrscheinlich, weil die pathophysiologische L-Argininkonzentration von 50 μM einen positiven Stress für die Keratinozyten darstellt, der ihre Proliferation durch diverse Effekte steigert.

Mit Hilfe von Propidiumiodid wurde im Durchflußzytometer der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt, um eine Verschiebung der Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der L-Argininkonzentration zu analysieren. Anschließend wurden die Zellen ihrem DNA-Gehalt entsprechend den Phasen des Zellzyklus zugeordnet, wobei jedoch keine L-argininabhängige Verschiebung der Zellzyklusphasen festgestellt wurde. Eine aktuelle Publikation dagegen zeigt, dass L-Arginin in T-Lymphozyten in der Lage ist, den Zellzyklus zu regulieren [91]. Eine L-Argininverarmung bewirkt in diesem Modell einen Arrest der Zellen in der G₀- und G₁-Phase, bedingt durch eine Blockierung der Expression des Cyclins D3 und der cyclinabhängigen Kinase 4 (cdk4) sowie durch eine verminderte Phosphorylierung des Rb-Proteins. Diese regulatorischen Mechanismen werden in den T-Zellen über die GCN2 Kinase reguliert, die zuständig für die Phosphorylierung von eIF2 α ist. In Keratinozyten scheint die Aktivierung dieses Signalweges anders zu sein, so dass in ihrem Fall ein anderer Regulationsmechanismus greifen muß.

Ein verändertes L-Argininangebot dürfte auch das zelluläre Redox-Verhältnis mit diversen Folgen für den Zellmetabolismus verändern. Es können Transkriptionsfaktoren wie Nrf2 (*nuclear factor erythroid-2 related factor 2*), der hauptsächlich durch Elektrophile reguliert wird, aktiviert werden, die wiederum an Promotorsequenzen binden, die antioxidative und detoxifizierende Gene regulieren, wie z.B. das ARE (*antioxidative-response-element*) [131]. Bestimmte L-Argininkonzentration könnten so die Expression dieser Gene fördern und zu einem verstärkten Wachstum der Zellen und erhöhter Protektion vor den Folgen von oxidativem Stress führen.

Die durch die limitierte L-Argininverfügbarkeit bedingte Phosphorylierung von GCN2 bewirkt weiterhin eine verstärkte Transkription von ATF4 (*activating transcription factor 4*) [128]. Dieser aktiviert wiederum andere Transkriptionsfaktoren und ist zuständig für die Expression von Genen, die in den Aminosäuremetabolismus involviert sind [97,132], um dem Aminosäuremangel entgegenzuwirken.

Ein anderer genregulatorisch wirksamer Sensor ist das AAR-Element (*amino-acid-response-element*). Es reagiert auf die intrazelluläre Konzentration von Aminosäuren und initiiert die Transkription entsprechender Gene [133]. An ihn können auch die Transkriptionsfaktoren der ATF-Familie binden (ATF2, 3, 4, 7).

Ein weiterer möglicher Aspekt, der eine Rolle in der Proliferation der Zellen spielen kann, ist NO. In residenten Keratinozyten ist kein iNOS Enzym vorhanden, dafür wird konstitutiv nNOS exprimiert. Weil die nNOS neben den Kofaktoren auch vom Substrat abhängig ist, ist es möglich, dass mit einer verminderten L-Argininkonzentration auch die nNOS-abhängige NO-Synthese sinkt. Mehrere Arbeiten konnten eine Abhängigkeit der Zellproliferation von der NO-Konzentration demonstrieren [27,134,135]. So kann bei einer extrazellulären L-Argininkonzentration von 50 μM genug L-Arginin für ein logarithmisches Wachstum der Zellen vorhanden sein und gleichzeitig die NO-Synthese so reduziert sein, dass die vorhandene NO-Konzentration einen proproliferativen Effekt hat. Bei einer absoluten L-Arginindepletion (0 μM) ist der Stress dagegen wahrscheinlich so groß, dass eine NO-abhängige verstärkte Proliferation nicht mehr zu detektieren ist.

Die Expression antioxidativer Gene kann durch ein verbessertes Redox-Verhältnis auch die Apoptoserate verringern oder zu schnellerem Wachstum führen, was letztlich zu einer Erhöhung der Zellzahl führt. Die vermutlich verminderte nNOS NO-Synthese kann sowohl das Redox-Verhältnis positiv beeinflussen als auch genregulatorische Eigenschaften haben, die eine Proliferation begünstigen.

Obwohl leider viele der zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht im Detail aufgeklärt sind, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass Veränderungen der L-Argininkonzentration einen starken Einfluss auf die Genexpression und den gesamten Zellmetabolismus ausüben. Da konzentrationsabhängig teilweise adverse Effekte vermittelt werden, ist die Kontrolle der L-Argininverfügbarkeit sowohl im Zellmodell als auch *in vivo* von größerer Bedeutung als lange, mit Blick auf den bedingt essentiellen Charakter von L-Arginin, angenommen wurde.

6. Effekte einer *M. hyorhinis* Infektion auf die iNOS/Arginase-Balance

Eine Infektion ist das klassische Beispiel, um eine Reaktion der Immunantwort zu untersuchen. In vorhergehenden Teilen dieser Arbeit wurde eine frühe Phase der Infektion bzw. Entzündung durch Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen des T_H1-Typs simuliert. Der nachfolgende Teil hingegen beschäftigt sich mit einer parasitären Infektion, die den Zellen in der Zellkultur kontrolliert zugefügt wurde. Die murinen Keratinozyten wurden mit einer definierten Anzahl von Mycoplasmen infiziert, um die Konsequenzen für den L-Argininmetabolismus auf zellbiologischer Ebene untersuchen zu können. Die verwendete Spezies *Mycoplasma hyorhinis* ist die am zweithäufigsten auftretende Kontamination in Zellkulturen. Da diese Parasiten zudem nicht direkt sichtbar sind, bleiben sie häufig unentdeckt. Um Mycoplasmen detektieren zu können, ist eine PCR oder eine Immunfärbung nötig.

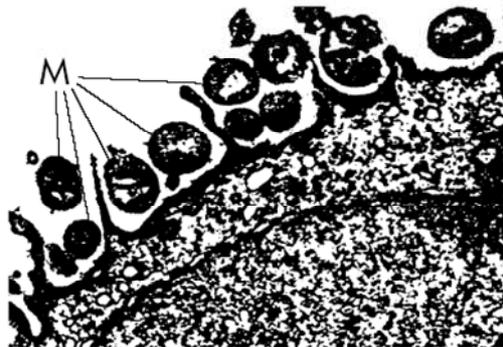


Abb. V. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer mit Mycoplasmen infizierten Hela-Zelle. Beachtenswert ist, wie viele Mycoplasmen (M) an der Zellmembran haften (Aufnahme von M.F. Barile).

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die sich mit den Auswirkungen einer Mycoplasmeninfektion auf den L-Argininmetabolismus und besonders mit dem Expressionsverhältnis von Arginase zu iNOS unter diesen Bedingungen beschäftigt. Dieses Verhältnis ist essentiell für die iNOS-abhängige NO-Syntheserate und somit ein zentraler Punkt der Immunabwehr, da beide Enzyme um ihr gemeinsames Substrat L-Arginin konkurrieren.

6.1 Modulation der Immunantwort durch *M. hyorhina*

Es wurde bereits beschrieben, dass eine *M. hyorhina* Infektion in Schweinen eine verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-8, IL-10, TNF- α) hervorruft und eine Immunantwort auslöst [136]. Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *M. hyorhina* Infektion den L-Argininmetabolismus von murinen Keratinozyten stark beeinflusst. Bemerkenswerterweise induzierte eine *M. hyorhina* Infektion die iNOS mRNA-Expression in Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen (Abb. IV 4.1), die jedoch nicht in der Synthese von iNOS Protein mündete. Ähnliches wurde auch für humane Kardiomyocyten nach einer Zytokinstimulierung berichtet. Die Zellen wurden mit IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und Lipopolysacchariden behandelt. Obwohl die iNOS mRNA-Expression über einen langen Zeitraum initiiert wurde, konnte kein iNOS Protein detektiert werden [137]. In den Keratinozyten erhöhte die *M. hyorhina* Infektion in Anwesenheit von Zytokinen zusätzlich die Expression des iNOS Proteins und erhöhte die iNOS Aktivität stark (Abb. IV.4.3). Wenn durch die Zytokinstimulierung eine iNOS Proteinsynthese induziert wird, bewirkt eine zusätzliche Mycoplasmeninfektion demnach einen synergistischen Effekt und führt so zu einer verstärkten Immunantwort. In einer aktuellen Arbeit von Kropf et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass die Arginase-1-Aktivität ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese der nicht-heilenden Leishmaniasis ist, weil die Arginaseaktivität ein unkontrolliertes Wachstum der Parasiten durch ein erhöhtes Angebot an Polyaminen unterstützt [138]. Eine der Hauptursachen für einen L-Argininmangel in Zellen *in vivo* ist die Koexpression von iNOS und Arginase-1, welche eine Substratkompetition der beiden Enzyme um L-Arginin bedingt [61]. Die Regulation der induzierbaren Form der NO-Synthasen findet vor allem auf der transkriptionellen Ebene statt [112], doch wurden kürzlich einige posttranskriptionelle Regulationsmechanismen für die NO-Synthese beschrieben. So ist berichtet worden, dass eine L-Arginindepletion in Astrozyten zu einer Inhibition der iNOS mRNA-Translation führt [94]. Eine verstärkte NO-Synthese, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist also nicht immer die Folge einer Infektion mit Pathogenen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *M. hyorhina* Infektion eine Verlagerung in der Balance zwischen iNOS und Arginase-1 zugunsten der iNOS verursacht, was sich in einer verstärkten NO-Synthese und einer abgeschwächten Arginaseaktivität manifestiert. Durch eine verminderte Arginaseaktivität, die zu einer erhöhten L-Argininverfügbarkeit führt, wird die erhöhte iNOS Aktivität während einer *M. hyorhina* Infektion begünstigt. Diese Expressionsmuster wurden auch in den frühen Phasen einer bakteriellen Infektion oder der Wundheilung beobachtet [115,139]. Aufgrund der langen

Halbwertszeit des Arginase-1 Proteins von ungefähr 100 Stunden im Zytosol [140] bleibt die Proteinexpression unverändert (Abb. IV. 4.5). Zusätzlich führt die erniedrigte Arginaseaktivität zu einer Verminderung der L-Ornithinkonzentration, welches ein Vorläufer des Polyamins Spermin ist. Da Spermin als Inhibitor der iNOS mRNA-Translation fungieren kann [141], kommt es in der Folge zu einer erhöhten iNOS Proteinexpression.

Während der Studien konnte eine verstärkte NF- κ B DNA-Bindungsaktivität durch die Dissoziation des I- κ B/NF- κ B-Komplexes und die Translokation von NF- κ B in den Nukleus, initiiert durch die Infektion, gezeigt werden. Dies geschieht auch in Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine während einer Mycoplasmeninfektion, während sich die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität zusätzlich in Gegenwart von Zytokinen steigerte, was mit der erhöhten NO-Synthese korrelierte (Abb. IV. 4.7). Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression des induzierbaren Transporters CAT-2 durch eine *M. hyorhina*s Infektion erhöht (Daten nicht gezeigt). Auch die CAT-2 Expression ist NF- κ B-abhängig reguliert [51], was die Konzentration an intrazellulär verfügbarem L-Arginin erhöht. Da sich die Hinweise in der Literatur verdichten, dass der CAT-2-medierte L-Argininimport einen intrazellulären L-Argininpool speist [50], der der iNOS zur Verfügung steht, ist eine gemeinsame Induktion besonders sinnvoll. Die Ergebnisse indizieren, dass *M. hyorhina*s infizierte murine Keratinozyten, bedingt durch eine Superaktivierung von NF- κ B in Anwesenheit von Zytokinen, eine starke inflammatorische Antwort generieren.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine *M. hyorhina*s Infektion die angeborene Immunantwort in murinen Keratinozyten durch eine verstärkte NO-Synthese und einer Verminderung der Arginaseaktivität potenziert.

6.2 Differentielle Regulation des humanen und des murinen iNOS-Gens

Zusätzlich zu den Experimenten mit murinen Keratinozyten wurden zur Beantwortung ausgewählter Fragestellungen auch humane Zellen eingesetzt. Dabei handelte es sich hauptsächlich um die humanen Colonkarzinomzellen DLD-1, die eine Deregulation von I- κ B aufweisen, die dazu führt, dass die iNOS permanent exprimiert wird. Die Expression lässt sich mit Hilfe von Zytokinen weiter steigern. Bei humanen Zellen ist es sehr schwierig, die iNOS-abhängige NO-Synthese zu messen, da die generierte Konzentration an NO wesentlich geringer ist als bei murinen Zellen. Weil die NO-Synthese im Fall von DLD-1 Zellen mit dem Griess-Assay bestimmt werden kann, boten diese sich als humanes Zellsystem an.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den murinen Keratinozyten ließen sich nach einer *M. hyorhina*s Infektion in humanen DLD-1 Zellen keine Veränderungen der iNOS Expression auf

transkriptioneller Ebene feststellen. Wahrscheinlich ist dieser Effekt in den unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen des humanen und des murinen *iNOS*-Gens begründet. Überraschend war dagegen, dass sich die *iNOS* Aktivität in den DLD-1 Zellen in Anwesenheit von Zytokinen und Mycoplasmen trotz einer unveränderten mRNA- und Proteinexpression (Abb. IV. 4.7 u. 4.8) fast verdoppelte (Abb. IV. 4.9). Murine Zellen exprimieren die *iNOS* als Antwort auf Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokinstimulierung, wobei beide Stimuli zu einer Aktivierung von NF- κ B führen. Dagegen benötigen die meisten humanen Zellen eine komplexere Zytokinkombination, die IL-1 β , TNF- α und Interferon- γ beinhaltet, so dass für ihre Aktivierung mehrere Signalwege in der Zelle eingeschaltet werden [23].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine differentielle Regulation des *iNOS*-Gens in murinen und in humanen Zellen. Zusätzlich hat eine Mycoplasmeninfektion vielerlei Effekte auf den Zellmetabolismus. Die erhöhte NO-Syntheserate unter proinflammatorischen Konditionen kann weit reichende Folgen für die Zellen, besonders im Hinblick auf die Genexpression haben. Dramatisch sind die Auswirkungen einer Mycoplasmeninfektion, wenn die Expressionsmuster der beiden entscheidenden Proteine *iNOS* und Arginase sowie deren Aktivität analysiert werden sollen, da diese, wie gezeigt, verändert werden.

VI. Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit erste genregulatorische Effekte von L-Arginin auf die durch NF- κ B regulierte iNOS, nicht aber auf das ebenfalls NF- κ B-abhängige IL-1 α auf Transkriptionsebene gezeigt wurden, wäre ein Screening weiterer Gene und Transkriptionsfaktoren äußerst interessant. Bei den Transkriptionsfaktoren sollte hier das Augenmerk auf ATF2 und ATF4 liegen, da diese an ARE (*antioxidative-response-element*) und AARE (*amino acid-response element*) binden können. Da durch L-Arginin auch die Translation reguliert wird, wären sowohl DNA-Mikroarrays als auch Proteomchips mit den entsprechenden Genen und Proteinen sehr interessant, um eine Übersicht zu erlangen, welche Gene und Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Auf diese Art und Weise könnte vielleicht auch geklärt werden, warum z.B. IL-1 α und wahrscheinlich auch andere Zytokine unverändert bleiben, andere Gene wie die iNOS jedoch nicht.

Ein zweiter wichtiger Ansatz, die gezeigten Phänomene aufzuklären, wäre zu untersuchen, ob eine limitierte L-Argininverfügbarkeit das ARE oder das AARE aktiviert und die Signalwege weiter zu verfolgen.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Zellsystem sind die Grundlagen und erste Einblicke für eine interessante weitere Forschung in Richtung „*argenomics*“ gelegt worden.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] Morris, S. M., Jr. Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**:508S-512S; 2006.
- [2] Schimke, R. T. Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* **62**:599-601; 1962.
- [3] Schimke, R. T. Enzymes of arginine metabolism in mammalian cell culture. I. Repression of argininosuccinatsynthetase and argininosuccinat. *J. Biol. Chem.* **239**:136-145; 1964.
- [4] Wu, G.; Morris, S. M., Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336** (Pt 1):1-17; 1998.
- [5] Mori, M.; Gotoh, T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**:715-719; 2000.
- [6] Haraguchi, Y.; Takiguchi, M.; Amaya, Y.; Kawamoto, S.; Matsuda, I.; Mori, M. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:412-415; 1987.
- [7] Herzfeld, A.; Raper, S. M. The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.* **153**:469-478; 1976.
- [8] Mori, M.; Gotoh, T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J. Nutr.* **134**:2820S-2825S; 2004.
- [9] Colletuori, D. M.; Morris, S. M., Jr.; Ash, D. E. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch. Biochem. Biophys.* **389**:135-143; 2001.
- [10] Shi, O.; Morris, S. M., Jr.; Zoghbi, H.; Porter, C. W.; O'Brien, W. E. Generation of a mouse model for arginase II deficiency by targeted disruption of the arginase II gene. *Mol. Cell Biol.* **21**:811-813; 2001.
- [11] Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**:593-615; 2001.
- [12] Marsden, P. A.; Schappert, K. T.; Chen, H. S.; Flowers, M.; Sundell, C. L.; Wilcox, J. N.; Lamas, S.; Michel, T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* **307**:287-293; 1992.
- [13] Nakane, M.; Schmidt, H. H.; Pollock, J. S.; Forstermann, U.; Murad, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **316**:175-180; 1993.
- [14] Becherel, P. A.; Le Goff, L.; Ktorza, S.; Ouaz, F.; Mencia-Huerta, J. M.; Dugas, B.; Debre, P.; Mossalayi, M. D.; Arock, M. Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**:2992-2995; 1995.

-
- [15] Moncada, S.; Higgs, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest* **21**:361-374; 1991.
- [16] Denninger, J. W.; Marletta, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**:334-350; 1999.
- [17] Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wei, L. H.; Bauer, P. M.; Wu, G.; del Soldato, P. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:4202-4208; 2001.
- [18] Brecht, D. S.; Hwang, P. M.; Snyder, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**:768-770; 1990.
- [19] Blottner, D.; Luck, G. Just in time and place: NOS/NO system assembly in neuromuscular junction formation. *Microsc. Res. Tech.* **55**:171-180; 2001.
- [20] Liew, F. Y.; Li, Y.; Severn, A.; Millott, S.; Schmidt, J.; Salter, M.; Moncada, S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur. J. Immunol.* **21**:2489-2494; 1991.
- [21] Drapier, J. C.; Wietzerbin, J.; Hibbs, J. B., Jr. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **18**:1587-1592; 1988.
- [22] Ding, A. H.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**:2407-2412; 1988.
- [23] Kleinert, H.; Schwarz, P. M.; Forstermann, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* **384**:1343-1364; 2003.
- [24] Green, S. J.; Meltzer, M. S.; Hibbs, J. B., Jr.; Nacy, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* **144**:278-283; 1990.
- [25] Kroncke, K. D.; Funda, J.; Berschick, B.; Kolb, H.; Kolb-Bachofen, V. Macrophage cytotoxicity towards isolated rat islet cells: neither lysis nor its protection by nicotinamide are beta-cell specific. *Diabetologia* **34**:232-238; 1991.
- [26] Suschek, C. V.; Krischel, V.; Bruch-Gerharz, D.; Berendji, D.; Krutmann, J.; Kroncke, K. D.; Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J. Biol. Chem.* **274**:6130-6137; 1999.
- [27] Krischel, V.; Bruch-Gerharz, D.; Suschek, C.; Kroncke, K. D.; Ruzicka, T.; Kolb-Bachofen, V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* **111**:286-291; 1998.
- [28] Marletta, M. A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.* **14**:488-492; 1989.
-

-
- [29] Anggard, E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* **343**:1199-1206; 1994.
- [30] Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**:327-343; 1995.
- [31] Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Suschek, C.; Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* **1**:1407-1420; 2001.
- [32] Hausladen, A.; Privalle, C. T.; Keng, T.; DeAngelo, J.; Stamler, J. S. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**:719-729; 1996.
- [33] Albina, J. E.; Mills, C. D.; Henry, W. L., Jr.; Caldwell, M. D. Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J. Immunol.* **144**:3877-3880; 1990.
- [34] Chakder, S.; Rattan, S. L-arginine deficiency causes suppression of nonadrenergic noncholinergic nerve-mediated smooth muscle relaxation: role of L-citrulline recycling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**:378-384; 1997.
- [35] Modolell, M.; Corraliza, I. M.; Link, F.; Soler, G.; Eichmann, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* **25**:1101-1104; 1995.
- [36] Sonoki, T.; Nagasaki, A.; Gotoh, T.; Takiguchi, M.; Takeya, M.; Matsuzaki, H.; Mori, M. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **272**:3689-3693; 1997.
- [37] Wang, W. W.; Jenkinson, C. P.; Griscavage, J. M.; Kern, R. M.; Arabolos, N. S.; Byrns, R. E.; Cederbaum, S. D.; Ignarro, L. J. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**:1009-1016; 1995.
- [38] Cama, E.; Colleluori, D. M.; Emig, F. A.; Shin, H.; Kim, S. W.; Kim, N. N.; Traish, A. M.; Ash, D. E.; Christianson, D. W. Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochemistry* **42**:8445-8451; 2003.
- [39] Cox, J. D.; Kim, N. N.; Traish, A. M.; Christianson, D. W. Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat. Struct. Biol.* **6**:1043-1047; 1999.
- [40] Kim, N. N.; Cox, J. D.; Baggio, R. F.; Emig, F. A.; Mistry, S. K.; Harper, S. L.; Speicher, D. W.; Morris, S. M., Jr.; Ash, D. E.; Traish, A.; Christianson, D. W. Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum. *Biochemistry* **40**:2678-2688; 2001.
-

-
- [41] Xu, L.; Hilliard, B.; Carmody, R. J.; Tsabary, G.; Shin, H.; Christianson, D. W.; Chen, Y. H. Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology* **110**:141-148; 2003.
- [42] McDonald, K. K.; Zharikov, S.; Block, E. R.; Kilberg, M. S. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J. Biol. Chem.* **272**:31213-31216; 1997.
- [43] Di Costanzo, L.; Sabio, G.; Mora, A.; Rodriguez, P. C.; Ochoa, A. C.; Centeno, F.; Christianson, D. W. Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:13058-13063; 2005.
- [44] Flynn, N. E.; Meininger, C. J.; Haynes, T. E.; Wu, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* **56**:427-438; 2002.
- [45] Lee, T. J.; Yu, J. G. L-Citrulline recycle for synthesis of NO in cerebral perivascular nerves and endothelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**:73-80; 2002.
- [46] Wu, G.; Knabe, D. A. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am. J. Physiol* **269**:R621-R629; 1995.
- [47] Swamy, M.; Zakaria, A. Z.; Govindasamy, C.; Sirajudeen, K. N.; Nadiger, H. A. Effects of acute ammonia toxicity on nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, arginase and related metabolites in different regions of rat brain. *Neurosci. Res.* **53**:116-122; 2005.
- [48] Closs, E. I.; Graf, P. Cationic amino acid transporters (CATs). Targets for the manipulation of NO-synthase activity? *Pharm. Biotechnol.* **12**:229-249; 1999.
- [49] Closs, E. I.; Graf, P.; Habermeier, A.; Cunningham, J. M.; Forstermann, U. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* **36**:6462-6468; 1997.
- [50] Nicholson, B.; Manner, C. K.; Kleeman, J.; MacLeod, C. L. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J. Biol. Chem.* **276**:15881-15885; 2001.
- [51] Hammermann, R.; Dreissig, M. D.; Mossner, J.; Fuhrmann, M.; Berrino, L.; Gothert, M.; Racke, K. Nuclear factor-kappaB mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and Up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol. Pharmacol.* **58**:1294-1302; 2000.
- [52] Vekony, N.; Wolf, S.; Boissel, J. P.; Gnauert, K.; Closs, E. I. Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* **40**:12387-12394; 2001.
- [53] Wolf, S.; Janzen, A.; Vekony, N.; Martine, U.; Strand, D.; Closs, E. I. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem. J.* **364**:767-775; 2002.
- [54] Morris, S. M., Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **22**:87-105; 2002.
-

-
- [55] Lortie, M. J.; Ishizuka, S.; Schwartz, D.; Blantz, R. C. Bioactive products of arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS and iNOS blockade. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **278**:C1191-C1199; 2000.
- [56] Morris, C. R.; Poljakovic, M.; Lavrisha, L.; Machado, L.; Kuypers, F. A.; Morris, S. M., Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **170**:148-153; 2004.
- [57] Canpolat, F. E.; Yurdakok, M.; Yigit, S.; Korkmaz, A.; Tekinalp, G. Blood L-arginine levels in early respiratory distress syndrome. *Pediatr. Pulmonol.* **40**:511-514; 2005.
- [58] Morris, C. R. New Strategies for the Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease : The Rationale for Arginine Therapy. *Treat. Respir. Med.* **5**:31-45; 2006.
- [59] Wu, G.; Meininger, C. J.; Knabe, D. A.; Bazer, F. W.; Rhoads, J. M. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **3**:59-66; 2000.
- [60] Kirk, S. J.; Hurson, M.; Regan, M. C.; Holt, D. R.; Wasserkrug, H. L.; Barbul, A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* **114**:155-159; 1993.
- [61] Bruch-Gerharz, D.; Schnorr, O.; Suschek, C.; Beck, K. F.; 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.* **162**:203-211; 2003.
- [62] Badwey, J. A.; Karnovsky, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**:695-726; 1980.
- [63] Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol* **271**:C1424-C1437; 1996.
- [64] Estevez, A. G.; Crow, J. P.; Sampson, J. B.; Reiter, C.; Zhuang, Y.; Richardson, G. J.; Tarpey, M. M.; Barbeito, L.; Beckman, J. S. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* **286**:2498-2500; 1999.
- [65] Reiter, C. D.; Teng, R. J.; Beckman, J. S. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **275**:32460-32466; 2000.
- [66] Rubbo, H.; Darley-Usmar, V.; Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* **9**:809-820; 1996.
- [67] Sawa, T.; Akaike, T.; Maeda, H. Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**:32467-32474; 2000.
- [68] Granger, D. L.; Hibbs, J. B., Jr.; Perfect, J. R.; Durack, D. T. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest* **81**:1129-1136; 1988.
-

-
- [69] James, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* **59**:533-547; 1995.
- [70] Nathan, C. F.; Hibbs, J. B., Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**:65-70; 1991.
- [71] Minion, F. C. Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Front Biosci.* **7**:d1410-d1422; 2002.
- [72] Ruuth, E.; Praz, F. Interactions between mycoplasmas and the immune system. *Immunol. Rev.* **112**:133-160; 1989.
- [73] Uphoff, C. C.; Drexler, H. G. Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol. Biol.* **290**:13-23; 2005.
- [74] Akaike, T.; Maeda, H. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* **101**:300-308; 2000.
- [75] Hayden, M. S.; Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**:2195-2224; 2004.
- [76] Hatada, E. N.; Nieters, A.; Wulczyn, F. G.; Naumann, M.; Meyer, R.; Nucifora, G.; McKeithan, T. W.; Scheidereit, C. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:2489-2493; 1992.
- [77] Satriano, J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino. Acids* **26**:321-329; 2004.
- [78] Cook, H. T.; Jansen, A.; Lewis, S.; Largen, P.; O'Donnell, M.; Reaveley, D.; Cattell, V. Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: interaction between nitric oxide synthase and arginase. *Am. J. Physiol* **267**:F646-F653; 1994.
- [79] Ketteler, M.; Border, W. A.; Noble, N. A. Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am. J. Physiol* **267**:F197-F207; 1994.
- [80] Frank, S.; Kampfer, H.; Wetzler, C.; Pfeilschifter, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.* **61**:882-888; 2002.
- [81] Bruch-Gerharz, D.; Ruzicka, T.; Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J. Invest Dermatol.* **110**:1-7; 1998.
- [82] Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* **1**:107-120; 1997.
- [83] Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C. L.; Penman, B. W.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:3030-3034; 1992.
- [84] Messmer, U. K.; Ankarcona, M.; Nicotera, P.; Brune, B. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **355**:23-26; 1994.
-

-
- [85] Heller, B.; Wang, Z. Q.; Wagner, E. F.; Radons, J.; Burkle, A.; Fehsel, K.; Burkart, V.; Kolb, H. Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J. Biol. Chem.* **270**:11176-11180; 1995.
- [86] Stamler, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**:931-936; 1994.
- [87] Weiss, G.; Wachter, H.; Fuchs, D. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol. Today* **16**:495-500; 1995.
- [88] Berendji, D.; Kolb-Bachofen, V.; Meyer, K. L.; Grapenthin, O.; Weber, H.; Wahn, V.; Kroncke, K. D. Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett.* **405**:37-41; 1997.
- [89] Tabuchi, A.; Sano, K.; Oh, E.; Tsuchiya, T.; Tsuda, M. Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett.* **351**:123-127; 1994.
- [90] Pilz, R. B.; Casteel, D. E. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ. Res.* **93**:1034-1046; 2003.
- [91] Rodriguez, P. C.; Quiceno, D. G.; Ochoa, A. C. L-Arginine availability regulates T lymphocyte cell cycle progression. *Blood* 2006.
- [92] Schnorr, O.; Schuier, M.; Kagemann, G.; Wolf, R.; Walz, M.; Ruzicka, T.; Mayatepek, E.; Laryea, M.; Suschek, C. V.; Kolb-Bachofen, V.; Sies, H. Arginase-1 overexpression induces cationic amino acid transporter-1 in psoriasis. *Free Radic. Biol. Med.* **38**:1073-1079; 2005.
- [93] Fernandez, J.; Lopez, A. B.; Wang, C.; Mishra, R.; Zhou, L.; Yaman, I.; Snider, M. D.; Hatzoglou, M. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J. Biol. Chem.* **278**:50000-50009; 2003.
- [94] Lee, J.; Ryu, H.; Ferrante, R. J.; Morris, S. M., Jr.; Ratan, R. R. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:4843-4848; 2003.
- [95] Rodriguez, P. C.; Zea, A. H.; Culotta, K. S.; Zabaleta, J.; Ochoa, J. B.; Ochoa, A. C. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J. Biol. Chem.* **277**:21123-21129; 2002.
- [96] Jefferson, L. S.; Kimball, S. R. Amino acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* **131**:2460S-2466S; 2001.
- [97] Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M.; Ron, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**:1099-1108; 2000.
- [98] Fafournoux, P.; Bruhat, A.; Jousse, C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.* **351**:1-12; 2000.
-

-
- [99] Wood, K. S.; Buga, G. M.; Byrns, R. E.; Ignarro, L. J. Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**:80-88; 1990.
- [100] Kroncke, K. D.; Kolb-Bachofen, V. Detection of nitric oxide interaction with zinc finger proteins. *Methods Enzymol.* **269**:279-284; 1996.
- [101] Corraliza, I. M.; Campo, M. L.; Soler, G.; Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* **174**:231-235; 1994.
- [102] Cassinotti, P.; Mietz, H.; Siegl, G. Suitability and clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes simplex virus infections. *J. Med. Virol.* **50**:75-81; 1996.
- [103] Tedeschi, E.; Menegazzi, M.; Yao, Y.; Suzuki, H.; Forstermann, U.; Kleinert, H. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. *Mol. Pharmacol.* **65**:111-120; 2004.
- [104] Birnboim, H. C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523; 1979.
- [105] Goren, I.; Linke, A.; Muller, E.; Pfeilschifter, J.; Frank, S. The suppressor of cytokine signaling-3 is upregulated in impaired skin repair: implications for keratinocyte proliferation. *J. Invest Dermatol.* **126**:477-485; 2006.
- [106] Giustizieri, M. L.; Albanesi, C.; Scarponi, C.; De Pita, O.; Girolomoni, G. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* **161**:1409-1418; 2002.
- [107] Gebauer, F.; Hentze, M. W. Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:827-835; 2004.
- [108] Kroncke, K. D.; Kolb-Bachofen, V. Measurement of nitric oxide-mediated effects on zinc homeostasis and zinc finger transcription factors. *Methods Enzymol.* **301**:126-135; 1999.
- [109] Thomas, T.; Thomas, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* **58**:244-258; 2001.
- [110] Schnorr, O.; Suschek, C. V.; Kolb-Bachofen, V. The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin. *J. Invest Dermatol.* **120**:1016-1022; 2003.
- [111] de Vera, M. E.; Shapiro, R. A.; Nussler, A. K.; Mudgett, J. S.; Simmons, R. L.; Morris, S. M., Jr.; Billiar, T. R.; Geller, D. A. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:1054-1059; 1996.
- [112] Kleinert, H.; Pautz, A.; Linker, K.; Schwarz, P. M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **500**:255-266; 2004.
-

-
- [113] Xia, Y.; Roman, L. J.; Masters, B. S.; Zweier, J. L. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J. Biol. Chem.* **273**:22635-22639; 1998.
- [114] Malinski, T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am. J. Cardiol.* **96**:13i-24i; 2005.
- [115] Kampfner, H.; Pfeilschifter, J.; Frank, S. Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair. *J. Invest Dermatol.* **121**:1544-1551; 2003.
- [116] Fehsel, K.; Kroncke, K. D.; Meyer, K. L.; Huber, H.; Wahn, V.; Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* **155**:2858-2865; 1995.
- [117] Jiang, H. Y.; Wek, S. A.; McGrath, B. C.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Cavener, D. R.; Wek, R. C. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol. Cell Biol.* **23**:5651-5663; 2003.
- [118] Kim, Y. M.; Son, K.; Hong, S. J.; Green, A.; Chen, J. J.; Tzeng, E.; Hierholzer, C.; Billiar, T. R. Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha. *Mol. Med.* **4**:179-190; 1998.
- [119] Oliver, B. L.; Cronin, C. G.; Zhang-Benoit, Y.; Goldring, M. B.; Tanzer, M. L. Divergent stress responses to IL-1beta, nitric oxide, and tunicamycin by chondrocytes. *J. Cell Physiol* **204**:45-50; 2005.
- [120] Petrov, T.; Underwood, B. D.; Braun, B.; Alousi, S. S.; Rafols, J. A. Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2alpha are paralleled by suppression of protein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *J. Neurotrauma* **18**:799-812; 2001.
- [121] Smirnova, J. B.; Selley, J. N.; Sanchez-Cabo, F.; Carroll, K.; Eddy, A. A.; McCarthy, J. E.; Hubbard, S. J.; Pavitt, G. D.; Grant, C. M.; Ashe, M. P. Global gene expression profiling reveals widespread yet distinctive translational responses to different eukaryotic translation initiation factor 2B-targeting stress pathways. *Mol. Cell Biol.* **25**:9340-9349; 2005.
- [122] Ghoreschi, K.; Mrowietz, U.; Rocken, M. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J. Mol. Med.* **81**:471-480; 2003.
- [123] Morris, C. R.; Kato, G. J.; Poljakovic, M.; Wang, X.; Blackwelder, W. C.; Sachdev, V.; Hazen, S. L.; Vichinsky, E. P.; Morris, S. M., Jr.; Gladwin, M. T. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* **294**:81-90; 2005.
- [124] Hanssen, H.; Brunini, T. M.; Conway, M.; Banning, A. P.; Roberts, N. B.; Mann, G. E.; Ellory, J. C.; Mendes Ribeiro, A. C. Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure. *Clin. Sci. (Lond)* **94**:43-48; 1998.
-

-
- [125] Bivalacqua, T. J.; Hellstrom, W. J.; Kadowitz, P. J.; Champion, H. C. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**:923-927; 2001.
- [126] Porembaska, Z.; Luboinski, G.; Chrzanowska, A.; Mielczarek, M.; Magnuska, J.; Baranczyk-Kuzma, A. Arginase in patients with breast cancer. *Clin. Chim. Acta* **328**:105-111; 2003.
- [127] Jiang, H. Y.; Wek, R. C. GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem. J.* **385**:371-380; 2005.
- [128] Wek, R. C.; Jiang, H. Y.; Anthony, T. G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:7-11; 2006.
- [129] Deng, J.; Lu, P. D.; Zhang, Y.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Sonenberg, N.; Harding, H. P.; Ron, D. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol. Cell Biol.* **24**:10161-10168; 2004.
- [130] Anthony, T. G.; McDaniel, B. J.; Byerley, R. L.; McGrath, B. C.; Cavener, D. R.; McNurlan, M. A.; Wek, R. C. Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J. Biol. Chem.* **279**:36553-36561; 2004.
- [131] Kang, K. W.; Lee, S. J.; Kim, S. G. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**:1664-1673; 2005.
- [132] Hinnebusch, A. G. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**:21661-21664; 1997.
- [133] Jousse, C.; Averous, J.; Bruhat, A.; Carraro, V.; Mordier, S.; Fafournoux, P. Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**:447-452; 2004.
- [134] Schleicher, M.; Brundin, F.; Gross, S.; Muller-Esterl, W.; Oess, S. Cell cycle-regulated inactivation of endothelial NO synthase through NOSIP-dependent targeting to the cytoskeleton. *Mol. Cell Biol.* **25**:8251-8258; 2005.
- [135] Zheng, J.; Wen, Y.; Austin, J. L.; Chen, D. B. Exogenous nitric oxide stimulates cell proliferation via activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol. Reprod.* **74**:375-382; 2006.
- [136] Jayagopala Reddy, N. R.; Wilkie, B. N.; Borgs, P.; Mallard, B. A. Cytokines in Mycoplasma hyorhinis-induced arthritis in pigs bred selectively for high and low immune responses. *Infect. Immun.* **68**:1150-1155; 2000.
- [137] Luss, H.; Li, R. K.; Shapiro, R. A.; Tzeng, E.; McGowan, F. X.; Yoneyama, T.; Hatakeyama, K.; Geller, D. A.; Mickle, D. A.; Simmons, R. L.; Billiar, T. R. Dedifferentiated human ventricular cardiac myocytes express inducible nitric oxide synthase mRNA but not protein in response to IL-1, TNF, IFNgamma, and LPS. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**:1153-1165; 1997.
-

-
- [138] Kropf, P.; Fuentes, J. M.; Fahrnich, E.; Arpa, L.; Herath, S.; Weber, V.; Soler, G.; Celada, A.; Modolell, M.; Muller, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.* **19**:1000-1002; 2005.
- [139] Munder, M.; Eichmann, K.; Moran, J. M.; Centeno, F.; Soler, G.; Modolell, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* **163**:3771-3777; 1999.
- [140] Schimke, R. T. Nutrition Classics. The Journal of Biological chemistry, 39:3808-17, 1964. The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. Robert T. Schimke. *Nutr. Rev.* **37**:291-293; 1979.
- [141] Bussiere, F. I.; Chaturvedi, R.; Cheng, Y.; Gobert, A. P.; Asim, M.; Blumberg, D. R.; Xu, H.; Kim, P. Y.; Hacker, A.; Casero, R. A., Jr.; Wilson, K. T. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J. Biol. Chem.* **280**:2409-2412; 2005.

VIII. Anhang

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinatsynthetase
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
CAT	kationische Aminosäuretransporter
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive NO-Synthase
CO ₂	Kohlendioxid
DETA/NO	(z)-1-[N-(2-Aminoethyl)-N-(2-amoniumethyl)amino]diazene-1,1,2-diolat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
I- κ B	Inhibitor von κ B
kD	kilo Dalton
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M.h.</i>	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIO	L-N-(-Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	NO-Synthasen
OAT	Ornithinaminotransferase
ODC	Ornithindecaboxylase
P5C	Pyrrolin-5-Carboxylase
PBS	gepufferte Salzlösung
RNOI	Reaktive Stickstoffoxidintermediate
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
RPMI	Roslyn Park Memorial Insitute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNOC	S-Nitrosocystein
TGF- β	<i>Transforminggrowthfactor-beta</i>
T _H 1	T-Helfer-Lymphozyten Subpopulation
T _H 2	T-Helfer-Lymphozyten Subpopulation
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
ü/N	über Nacht
v/v	Volumenprozent
1 U	1 unit/Enzymeinheit

Lebenslauf**Persönliche Angaben**

Name Guido Kagemann
 Adresse Brückenstr. 23 59494 Soest
 Geburtsdatum 08.02.1977
 Geburtsort Soest
 Familienstand ledig

Hochschulausbildung**Abschluss:**

10/2003-12/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) an dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf

Doktorarbeit

„Einfluss von limitierter L-Argininverfügbarkeit auf die Regulation der Genexpression“

Wissenschaftliche Schwerpunkte

Zellbiologie; Signaltransduktion; Zellmetabolismus; proinflammatorische Prozesse; Molekularbiologie

09/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Bielefeld

05/2003

Abschluss:

Diplom-Biologe

10/1997-05/2003

Studium der Biologie

Universität Bielefeld

Studienschwerpunkte:

Molekularbiologie, Genetik, Mikrobiologie und Proteomik

Praktische Diplomarbeit:

„Molekularbiologische Analyse des konjugativen Quecksilberresistenzplasmids pSB102 mit Hilfe ausgewählter pSB102::Tn5 Derivate und Untersuchung des Einflusses des Plasmids auf das Transkriptom und Proteom“ des Wirtes *Sinorhizobium meliloti*“

	Zivildienst
08/1996-09/1997	Rettungssanitäter an der Rettungswache Soest
	Schul- und Berufsausbildung
08/1987-05/1996	Städtisches Aldegrevier-Gymnasium Soest
	Abschluss: Abitur
08/1983-07/1987	Hellweg Grundschule Ampen

Publikationsverzeichnis

1. Originalarbeiten

Guido Kagemann, Helmut Sies and Oliver Schnorr (2006); Journal of Molecular Medicine; under review

Limited availability of L-arginine increases DNA binding activity of NF- κ B and affects expression of proinflammatory genes

Guido Kagemann, Birgit Henrich, Michaela Kuhn, Hartmut Kleinert und Oliver Schnorr (2005); Biol Chem., 386(10):1055-63

Impact of *Mycoplasma hyorhinitis* infection on L-arginine metabolism: Differential regulation of the human and murine iNOS gene

Oliver Schnorr, Maximilian Schuier, Guido Kagemann, Ronald Wolf, Markus Walz, Thomas Ruzicka, Ertan Mayatepek, Maurice Laryea, Christoph V. Suschek, Victoria Kolb-Bachofen and Helmut Sies (2005); Free Radic.Biol.Med., 38:1073-1079

Arginase-1 overexpression induces cationic amino acid transporter-1 in psoriasis

2. Posterpräsentationen

Guido Kagemann, Helmut Sies and Oliver Schnorr

Limited availability of L-arginine increases DNA binding activity of NF- κ B and affects expression of proinflammatory genes

3rd international conference on oxidative stress in skin medicine and biology, (September 2006), Andros, Griechenland

Guido Kagemann, Helmut Sies and Oliver Schnorr

L-Arginine availability contributes to expression pattern of proinflammatory genes

57. Mosbacher Kolloquium (April 2006), Mosbach, Deutschland

Guido Kagemann, Birgit Henrich, Michaela Kuhn, Hartmut Kleinert and Oliver Schnorr

Impact of *Mycoplasma hyorhinitis* infection on L-arginine metabolism:

Differential regulation of the human and murine iNOS gene

GBM Jahrestagung (September 2005), Berlin, Deutschland

Schnorr O., Schuier M., Kagemann G., Wolf R., Walz M., Ruzicka T., Mayatepek E., Laryea M., Suschek C.V., Kolb-Bachofen V., and Sies H.

Arginase-1 overexpression induces CAT-1 in psoriasis

GBM Jahrestagung (September 2005), Berlin, Deutschland

Maximilian Schuier, Guido Kagemann, Ronald Wolf and Oliver Schnorr
Cationic amino acid transporter expression in psoriasis
9. Tagung der NO-Gesellschaft (Oktober 2004), Mainz, Deutschland

Danksagung

Danken möchte ich hiermit Prof. Dr. H. Sies für die Möglichkeit, das interessante Thema an seinem Institut bearbeiten zu können.

Dr. Oliver Schnorr danke ich für die kompetente Betreuung und die konstruktiven Gespräche während meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Kollegin Michaela Kuhn, die nicht nur in konstruktiven wissenschaftlichen Gesprächen, sondern auch bei privaten Höhen und Tiefen immer da war.

Weiterhin möchte ich den anderen Kollegen des Instituts, der Arbeitsgruppe der Immunbiologie und der Pathologie für die unterhaltsamen und anregenden Gespräche in den Mittags- und Kaffeepausen danken.

Ich danke besonders meinen Eltern und meinem Bruder, die mich unterstützt und ständig ermutigt haben, durchzuhalten.

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 26.10.2006