

**Regulation und funktionelle Bedeutung der  
Arginase und Arginase-abhängiger  
Stoffwechselwege in Atemwegszellen der Ratte**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Mareille Warnken

aus

Hannover

Bonn 2008



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. med. Kurt Racké
2. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) publiziert.

Erscheinungsjahr: 2009

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.12.2008



# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>L-Arginin-Stoffwechsel.....</b>	<b>2</b>
1.1	L-Arginin-Synthese .....	2
1.2	L-Arginin-Transport.....	3
1.3	L-Arginin-Katabolismus .....	5
1.4	Stickstoffmonoxid (NO).....	7
1.4.1	NO-Synthetisierende Enzyme .....	7
1.4.2	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von NO.....	10
1.5	Arginase .....	12
1.5.1	Arginase-Isoenzyme .....	13
1.5.2	Arginase und Polyaminsynthese .....	17
1.5.3	Arginase und Prolinsynthese .....	19
1.5.4	Arginase und NO-Synthese .....	21
<b>2</b>	<b>Pathophysiologische Bedeutung der Arginase bei <i>Asthma bronchiale</i> ..</b>	<b>25</b>
2.1	Entzündliche Prozesse .....	27
2.2	NO in Asthma .....	29
2.3	Remodelingprozesse .....	32
<b>B</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>37</b>
<b>C</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>1</b>	<b>Material .....</b>	<b>39</b>
1.1	Chemikalien und Enzyme .....	39
1.2	Testsubstanzen .....	42
1.3	Antikörper .....	43
1.4	Primer .....	44
1.5	Arbeitsmaterial und Geräte.....	45
1.6	Software .....	46
<b>2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>47</b>
2.1	Zellkultur .....	47
2.1.1	Primäre Alveolarmakrophagen der Ratte .....	47
2.1.2	Primäre Atemwegsfibroblasten der Ratte .....	48
2.2	Enzym-Assays .....	49
2.2.1	Arginase-Assay.....	49
2.2.2	Spektralphotometrische Bestimmung von Nitrit.....	51

2.3	mRNA Expressionsanalyse .....	52
2.3.1	RNA-Präparation .....	52
2.3.2	Konzentrationsbestimmung der RNA .....	52
2.3.3	Reverse Transkription.....	53
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	53
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	54
2.4	Westernblot-Analyse .....	56
2.4.1	Protein-Präparation.....	56
2.4.2	Proteinkonzentrationsmessung nach Lowry .....	57
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	57
2.4.4	Immunoblot .....	58
2.4.5	Strippen bereits detektierter Membranen .....	60
2.4.6	Kollagenaseverdau .....	60
2.5	Proliferations-Assay.....	61
2.6	Statistik .....	62

## **D Ergebnisse ..... 63**

### **1 Einfluss von TGF- $\beta$ auf Aktivität und Expression der Arginase-Isoenzyme sowie der induzierbaren NO-Synthase in zwei verschiedenen Zellsystemen der Atemwege ..... 63**

1.1	Expression und Aktivität der Arginasen und iNOS in Alveolarmakrophagen und Atemwegsfibroblasten .....	63
1.2	Einfluss des TGF- $\beta$ auf Arginase- und iNOS-Aktivität .....	66
1.2.1	Alveolarmakrophagen.....	66
1.2.2	Atemwegsfibroblasten .....	66
1.3	Beeinflussung des TGF- $\beta$ -Effekts auf die Arginaseaktivität durch verschiedenartige Kosignale .....	68
1.3.1	Kombination mit IL-4 und IL-13.....	68
1.3.2	Kombination mit LPS .....	71
1.4	Analyse der funktionellen Koaktivität von TGF- $\beta$ und LPS auf Expressionsebene .....	73
1.5	Mechanistische Analyse der Koaktivität von TGF- $\beta$ und LPS .....	75
1.5.1	Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren.....	75
1.5.2	Modifikationen an Chromatinstrukturen mit Einfluss auf die Transkription .....	76

### **2 Untersuchung zur funktionellen Bedeutung der Arginase in primären Atemwegsfibroblasten..... 81**

2.1	Proliferation .....	81
2.1.1	Einfluss der Serumkonzentration.....	81
2.1.2	Einfluss der Interleukine IL-4 und IL-13 .....	83
2.1.3	Einfluss der Arginaseinhibitoren norNOHA und BEC .....	84
2.1.4	Einfluss des Ornithindecaboxylaseinhibitors DFMO.....	86
2.1.5	Einfluss des IL-4 auf die Expression der ODC .....	88
2.2	Kollagensynthese .....	89

---

<b>E</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>93</b>
<b>1</b>	<b>Aktivität und Expression der Arginase I und II sowie iNOS unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli .....</b>	<b>93</b>
1.1	Expressions- und Aktivitätsniveau der Arginase-Isoenzyme und der induzierbaren NO-Synthase in verschiedenen Zellsystemen der Atemwege.....	93
1.2	Induzierbarkeit der Arginase I und II sowie der iNOS durch TGF- $\beta$ .....	95
1.3	Mechanismen der Koaktivität von TGF- $\beta$ und LPS .....	98
<b>2</b>	<b>Funktionelle Bedeutung der Arginase in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte .....</b>	<b>103</b>
2.1	Arginase und Proliferation .....	103
2.2	Arginase und Kollagensynthese .....	107
2.3	Speziesabhängige Unterschiede .....	108
<b>F</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>G</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>115</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>





## A Einleitung

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden erstmalig hohe Stoffwechselaktivitäten der Arginase als Enzym, welches die Hydrolyse der Aminosäure *L*-Arginin zu *L*-Ornithin und Harnstoff katalysiert, in der Leber identifiziert. Jedoch führte erst die Entdeckung des Harnstoffzyklus als Mechanismus zur Entgiftung von Ammoniak in der Leber 1935 durch Krebs und Henseleit dazu, dass die wichtige Rolle der vielfältigen Aminosäure *L*-Arginin für Physiologie und Metabolismus erkannt wurde (Wu und Morris, Jr. 1998).

Inzwischen ist bekannt, dass die Arginase als klassisches Enzym des Harnstoffzyklus in zahlreichen Geweben exprimiert wird, die nicht über die komplette Enzymausstattung des Harnstoffzyklus verfügen; so z.B. auch in der Lunge (Que et al. 1998a; Wu und Morris, Jr. 1998).

Die biologische Funktion der extrahepatischen Arginase ist noch nicht abschließend geklärt. Sie ist jedoch involviert in die Regulation von Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese und Zellwachstum. So führt beispielsweise die hohe Arginaseaktivität unter Entzündungsbedingungen in aktivierten Makrophagen zur Substratlimitierung für die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und somit zu reduzierter Bildung des zytotoxischen NOs. Wohingegen die zeitgleiche Bereitstellung der Aminosäure *L*-Ornithin als Vorläufer für die Synthese von Polyaminen und *L*-Prolin die Wundheilung positiv beeinflusst (Meurs et al. 2003; Curran et al. 2006).

Vor dem Hintergrund dieser Fragestellungen betrachtet die folgende Arbeit die Regulation der Arginase durch verschiedene Zytokine im Wechselspiel mit der NO-Synthese an Primärkulturen von Alveolarmakrophagen und Atemwegs-fibroblasten der Ratte. Weiterhin wird die funktionelle Bedeutung der Arginase in Remodelingprozessen im Hinblick auf deren Beitrag an Zellproliferation und Kollagensynthese beleuchtet. Im Rahmen dieser Einleitung wird dabei zunächst der Argininstoffwechsel in Säugetierzellen näher beschrieben, um anschließend seine Bedeutung für physiologische bzw. pathophysiologische Prozesse in den Atemwegen zu charakterisieren.

# 1 **L-Arginin-Stoffwechsel**

*L*-Arginin ist eine semiessentielle Aminosäure, die sehr vielseitig am metabolischen Geschehen beteiligt ist. Nicht nur, dass sie in wechselseitiger Beziehung mit den Aminosäuren *L*-Prolin und *L*-Glutamat steht, sie dient außerdem als Vorläufer der Synthese von Proteinen, Stickstoffmonoxid (NO), Kreatin, Polyaminen, Agmatin und Harnstoff. Die unterschiedlichen Prozesse laufen nicht in allen Zellen parallel ab, sondern werden je nach Zelltyp, Alter und Entwicklungsstadium, Ernährungs- und Gesundheitsstatus differenziert. Argininmetabolismus wird außerdem durch die Aktivität verschiedener Transportsysteme, die *L*-Arginin und seine Metabolite durch Plasma- und Mitochondrienmembranen transportieren, moduliert. Ferner werden diverse Schlüsselenzyme des Argininmetabolismus als Isoenzyme exprimiert, deren Expressionsstatus als Antwort auf verschiedenartige Stimuli in wechselnden Gesundheitsstadien schnell modifiziert werden kann (Morris, Jr. 2007).

## 1.1 **L-Arginin-Synthese**

Freies *L*-Arginin erreicht eine durchschnittliche Plasmakonzentration von ~80-120 µM. Der Bedarf von ~25 g/d wird durch Proteindegradation, endogene Synthese und Resorption aus der Nahrung gedeckt (Luiking und Deutz 2007). Hierbei gilt die Proteindegradation als Hauptquelle freien *L*-Arginins im Plasma. Ferner sind die Raten der endogenen Synthese und der Argininresorption voneinander unabhängig. Die Argininhomöostase wird demnach eher durch Modulation des Katabolismus als durch Beeinflussung der Synthese aufrecht gehalten (Morris, Jr. 2006). Somit stellt *L*-Arginin eine potentiell essentielle Aminosäure dar, die nur in katabolischen Stresssituationen, wie z.B. Entzündung, Wundheilung oder Infektion, exogen zugeführt werden muss (Morris, Jr. 2007).

Endogen synthetisiertes *L*-Arginin (*siehe Abb. 1*) entsteht aus *L*-Citrullin, das primär im Dünndarmepithel als ein Produkt des Glutaminmetabolismus generiert wird. Hierbei reagieren die Edukte *L*-Ornithin, NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> katalysiert durch die Enzyme Carbamylphosphatsynthase (CPS I) und Ornithintranscarbamylase (OTC) zunächst zu *L*-Citrullin (1. und 2. Enzym des Harnstoffzyklus). Im nächsten Schritt wird die

2

Umformung des *L*-Citrullins zu *L*-Arginin durch aufeinander folgende Reaktionen der Enzyme Argininosuccinatsynthase (AS) und Argininosuccinatlyase (AL) vermittelt (3. und 4. Enzym des Harnstoffzyklus), die überwiegend renal im proximalen Tubulus ablaufen (Mori und Gotoh 2000). In der Leber werden große Mengen *L*-Arginin durch vorgenannte Enzymreaktionen synthetisiert, die jedoch durch rasche Weitermetabolisierung im Verlauf des Harnstoffzyklus anderen Stoffwechselwegen nicht zur Verfügung stehen (Mori und Gotoh 2000). In NO-produzierenden Zellen finden sich die beiden Enzyme AS und AL häufig koexprimiert mit der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), der *L*-Arginin als Substrat dient (Morris, Jr. 2007). Sie wären somit in der Lage, bei der NO-Produktion anfallendes *L*-Citrullin zu *L*-Arginin zu regenerieren (Ricciardolo et al. 2005). Die Relevanz des als Citrullin-NO-Zyklus bezeichneten Stoffwechselweges wird jedoch kontrovers diskutiert (Baydoun et al. 1994; Hammermann et al. 1998) und konnte für Alveolarmakrophagen der Ratte ausgeschlossen werden (Hammermann et al. 1998).

## 1.2 *L*-Arginin-Transport

Zusätzlich zur *de novo* Synthese wird die Verfügbarkeit des *L*-Arginins für Stoffwechselprozesse durch die Aktivität ihrer Transporter in den Plasma- und Mitochondrienmembranen beeinflusst. Die Lipiddoppelschicht biologischer Membranen ist prinzipiell für hydrophile Moleküle wie *L*-Arginin undurchlässig. Somit sind spezielle Carrierproteine notwendig, um einen adäquaten Stofftransport zwischen verschiedenen Kompartimenten zu gewährleisten. Spezifische Transporter für kationische Aminosäuren, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, sind gut charakterisiert, wohingegen Informationen über deren Transport durch Mitochondrienmembranen nach wie vor fehlen (Morris, Jr. 2007).

In den meisten Zellen wird der Argininbedarf vorrangig durch die Aufnahme extrazellulären *L*-Arginins über spezifische Transportsysteme, wie z.B. System  $y^+$ ,  $b^+$ ,  $b^{0,+}$ ,  $B^{0,+}$  oder  $y^+L$ , gedeckt, die sich voneinander durch ihre Substratspezifität gegenüber neutralen und basischen Aminosäuren unterscheiden lassen (Deves und Boyd 1998). System  $y^+$  stellt hierbei den wichtigsten Mechanismus für die Aufnahme kationischer Aminosäuren dar. Neben seiner hohen Substratspezifität für *L*-Arginin, *L*-Lysin und *L*-Ornithin, zeichnet es sich durch  $Na^+$ - und pH-unabhängigen Transport

sowie durch Transstimulierbarkeit, d.h. Stimulation durch Anwesenheit von Substrat auf der *trans*-Seite der Membran, aus. Insgesamt wurden vier Proteine identifiziert, die spezifische Transporter für kationische Aminosäuren (CAT) darstellen und funktionelle Merkmale des Systems  $y^+$  aufweisen: CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-3, wobei CAT-2A und CAT-2B unterschiedliche Splicevarianten darstellen. Sie unterscheiden sich in ihrer Substrataffinität, ihrer Sensitivität für Transstimulation und ihrer Gewebeverteilung (Closs et al. 2004). CAT-1 wird mit Ausnahme adulter Hepatozyten ubiquitär exprimiert; CAT-2A findet sich überwiegend in der Leber. Die Expression von CAT-2B wird in verschiedenen Zelltypen unter inflammatorischen Bedingungen induziert, wohingegen sich CAT-3 spezifisch im Gehirn wieder findet (Mori und Gotoh 2000; Luiking und Deutz 2007).

Alveolarmakrophagen der Maus (Closs et al. 1993), der Ratte (Racké et al. 1998) und die murine Makrophagenzelllinie J774 (Kakuda et al. 1999) exprimieren mRNA sowohl für CAT-1 als auch für CAT-2B. Bereits 1987 konnten Hibbs *et al.* Hinweise darauf liefern, dass die Verfügbarkeit von *L*-Arginin einen limitierenden Faktor für die NO-Synthese darstellt (Hibbs, Jr. et al. 1987). Vor diesem Hintergrund wurde für murine Peritonealmakrophagen (Sato et al. 1992) sowie für J774 Makrophagen (Bogle et al. 1992) und Alveolarmakrophagen der Ratte (Hammermann et al. 2000a) nach Induktion der iNOS, z.B. durch LPS, eine verstärkte Expression der CAT-2B-mRNA nachgewiesen, wohingegen CAT-1 unbeeinflusst blieb. Parallel hierzu wurde in Alveolarmakrophagen der Ratte eine veränderte Aufnahmecharakteristik zugunsten des *L*-Arginins (Messler-Dreissig et al. 2000) sowie eine simultane Regulation von iNOS und CAT-2B über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B beobachtet (Hammermann et al. 2000a). In zytokinaktivierten Knochenmarksmakrophagen aus CAT-2 *knock out*-Mäusen wurde im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Produktion sowohl von Nitrit als auch von Polyaminen und *L*-Prolin festgestellt (Yeramian et al. 2006). In der Summe stellen diese Mechanismen ein ausreichendes Substratangebot für iNOS und Arginasen bei stimuliertem Argininmetabolismus in aktivierten Makrophagen sicher.

In Fibroblasten hingegen ist die CAT-2B-Expression von geringer Bedeutung. Die NO-Produktion durch Fibroblasten spielt beispielsweise in der Wundheilung eine wichtige Rolle. Jedoch kann der erhöhte Argininbedarf neben dem Transport über CAT-1 durch von Fibroblasten zusätzlich exprimierte Systeme, wie z.B. das System  $y^+L$ , kompensiert werden (Nicholson et al. 2002).

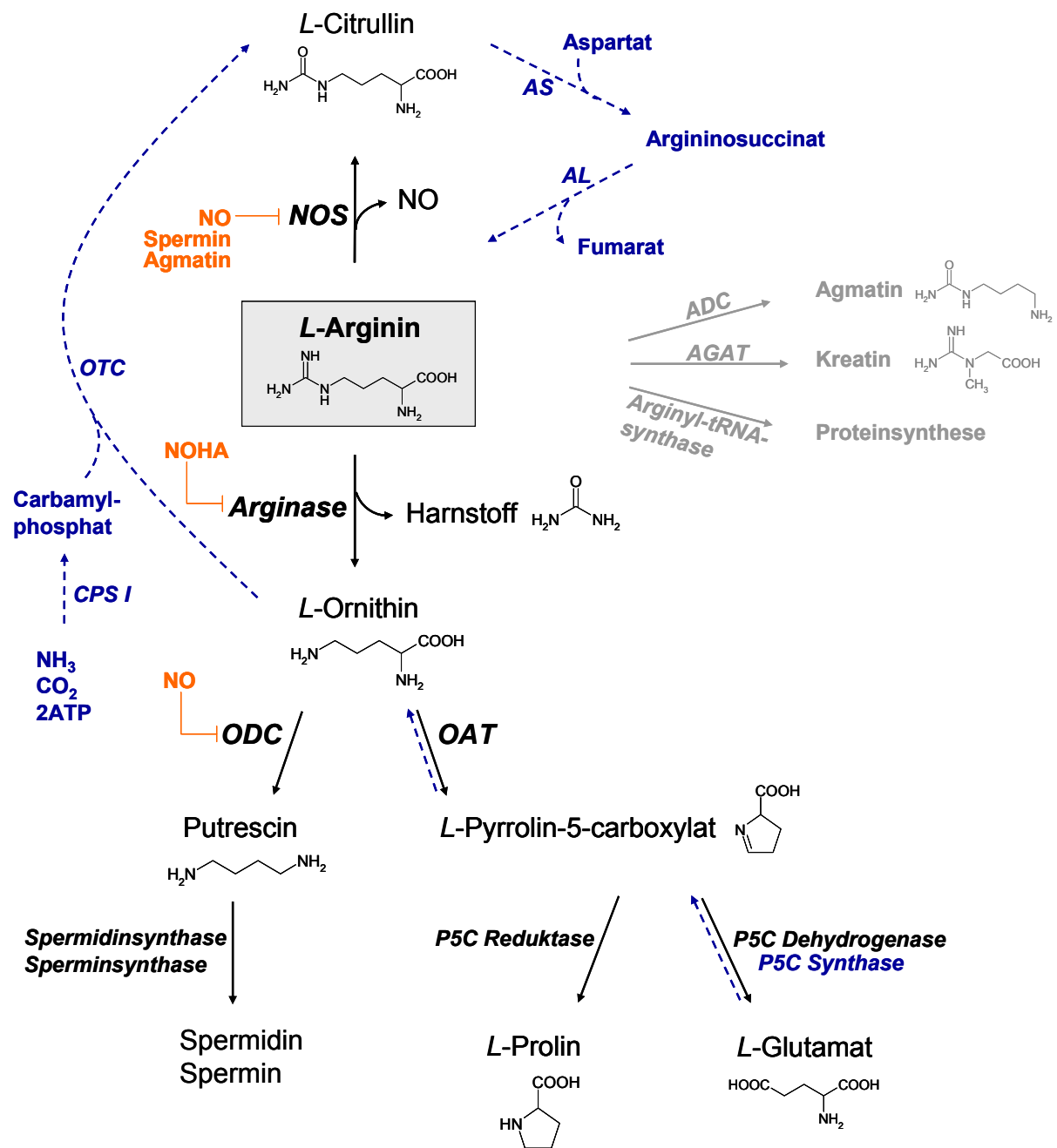
### **1.3 L-Arginin-Katabolismus**

Der in *Abb. 1* vereinfacht dargestellte Argininmetabolismus steigert seine Komplexität durch gewebespezifische, zellspezifische und kompartimentspezifische Expression der beteiligten Enzyme und deren Isoformen (Morris, Jr. 2004a). So findet z.B. die Kreatinsynthese durch die Arginin:Glycin Aminotransferase (AGAT) nahezu ausschließlich in den Nieren, der Bauchspeicheldrüse und zu einem geringeren Teil auch in der Leber statt. Kreatin dient zur Regeneration des Energieträgers ATP im Skelettmuskel, und bei seiner Synthese fällt als Nebenprodukt *L*-Ornithin an (Wu und Morris, Jr. 1998; Morris, Jr. 2004b).

Quantitativ betrachtet tragen die Proteinsynthese und der Abbau zu *L*-Ornithin und Harnstoff durch das Enzym Arginase den größten Teil zum Argininumsatz bei. *L*-Ornithin kann seinerseits durch die Ornithindecaboxylase (ODC) zu Polyaminen weitermetabolisiert werden, die für Zellwachstum und Differenzierung bedeutsam sind (Luiking und Deutz 2007). Das Enzym findet sich im Zytosol und kann durch  $\alpha$ -Difluoromethylornithin (DFMO) selektiv und irreversibel gehemmt werden (Wallace et al. 2003). Alternativ wird *L*-Ornithin durch die mitochondrial lokalisierte Ornithinaminotransferase (OAT) umgesetzt und trägt somit zur Bereitstellung des *L*-Prolins bei, welches unerlässlich für die Synthese von Kollagen ist (Luiking und Deutz 2007).

Die Arginindecaboxylase (ADC) konvertiert *L*-Arginin zu Agmatin, welches durch Agmatinase zu Putrescin und Harnstoff umgesetzt werden kann. Somit ergibt sich eine alternative Möglichkeit der Polyaminsynthese (Mistry et al. 2002). Die Expression der ADC im Säugetierorganismus wird jedoch kontrovers diskutiert (Coleman et al. 2004; Zhu et al. 2004; Morris, Jr. 2007). Des Weiteren ist gezeigt worden, dass Agmatin hemmende Effekte sowohl auf die iNOS-Funktion ausübt als auch auf die Zellproliferation durch Modulation des Polyaminmetabolismus (Satriano 2004; Wolf et al. 2007).

In einem weiteren Stoffwechselweg wird *L*-Arginin durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen zu Stickstoffmonoxid (NO) und *L*-Citrullin katabolisiert. Die Tatsache, dass *L*-Arginin die einzige Quelle für die NO-Produktion darstellt, lässt dies zu einem bedeutenden Umsatzweg dieser Aminosäure werden (Luiking und Deutz 2007).



**Abb.1: L-Argininsynthese und -metabolismus**

CPS I	Carbamoylphosphatsynthase	NOS	NO-Synthase
OTC	Ornithintranscarbamylase	ODC	Ornithindecaboxylase
AS	Argininosuccinatsynthase	OAT	Ornithinaminotransferase
AL	Arginiosuccinatlyase	P5C	L-Pyrrolin-5-carboxylat
ADC	Arginindecaboxylase	NOHA	N <sup>ω</sup> -Hydroxy-L-arginin
AGAT	Arginin:Glycin Aminotransferase		

## 1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

### 1.4.1 NO-Synthetisierende Enzyme

Die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) aus *L*-Arginin wird durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Im Säugetierorganismus wurden drei NOS-Isoformen identifiziert und deren Proteinstruktur und die Struktur ihrer genomischen DNA aufgeklärt. NOS I, II und III, oder alternativ nNOS, iNOS und eNOS benannt, werden durch drei verschiedene Gene kodiert, die sich entsprechend auf den Chromosomen 12, 17 und 7 wiederfinden. Die Aminosäuresequenzen der drei Isoformen zeigen  $\leq 59\%$  Sequenzhomologie und sind im Vergleich verschiedener Spezies für NOS I und III  $\geq 90\%$  und für NOS II  $\geq 80\%$  konserviert (Förstermann et al. 1995). Aktive NO-Synthasen bilden ein Heterotetramer aus zwei NOS-Molekülen und zwei Molekülen Calmodulin. Konvertierung des *L*-Arginins zu NO und *L*-Citrullin über das Intermediat  $N^{\omega}$ -Hydroxy-*L*-Arginin (NOHA) erfolgt durch Oxidation des Guanidinstickstoffs des *L*-Arginins in einer 5-Elektronen-Redoxreaktion unter Verwendung molekularen Sauerstoffs und NADPH als Kosubstrate. Alle Isoformen enthalten FAD, FMN und Häm als prosthetische Gruppen und benötigen Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als Kofaktor (Korhonen et al. 2005).

NOS I (nNOS, ursprünglich entdeckt in Neuronen) und NOS III (eNOS, ursprünglich entdeckt in Endothelzellen) sind *low-output* NO-Synthasen. Sie werden im Ruhezustand von verschiedenen Zellen konstitutiv exprimiert und daher auch unter der Bezeichnung cNOS zusammengefasst. Durch einen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration, wird die Bindung zwischen Calmodulin und NOS stabilisiert und daraufhin die NO-Produktion aktiviert (Korhonen et al. 2005). Die so induzierte NO-Freisetzung hält wenige Sekunden an und führt zu femto- bis picomolaren NO-Konzentrationen. Die Einstellung der intrazellulären Calciumkonzentration kann durch Aktivierung von Rezeptoren, wie z.B. für ATP, ADP, Histamin, Acetylcholin oder *L*-Glutamat, aber auch in Form von mechanischer Stimulation durch die Schubspannung des Blutstromes erfolgen (Schmidt 1994). Allerdings findet auch eine moderate Regulation der konstitutiv exprimierten Isoformen auf Ebene der Genaktivität statt, die durch verschiedene Mediatoren, wie beispielsweise die

Scherspannung des Blutstromes oder oxidiertes LDL (Low-Density-Lipoprotein), vermittelt wird (Nishida et al. 1992; Nathan und Xie 1994).

NOS II (iNOS, ursprünglich entdeckt in Makrophagen) stellt eine *high-output* NO-Synthase dar. Zwischen iNOS und Calmodulin liegt auch bei geringer intrazellulärer Calciumkonzentration eine feste Bindung vor (Korhonen et al. 2005). Infolgedessen produziert sie über einen langen Zeitraum (Stunden bis Tage) konstant NO-Konzentrationen im zytotoxischen nanomolaren Bereich, was eine wichtige Komponente der antimikrobiellen und antineoplastischen Aktivität von Makrophagen repräsentiert. Somit ist die Aktivität der iNOS weitestgehend (human) oder vollständig (Maus, Ratte)  $Ca^{2+}$ -unabhängig (Förstermann et al. 1995). In der Regel findet keine direkte Modifikation der Enzymaktivität der iNOS statt. An Makrophagenzelllinien der Maus, J774 (Assreuy et al. 1993), und der Ratte, NR8383 (Griscavage et al. 1993), ist allerdings ein negativer Feedbackmechanismus durch NO selbst, jedoch nicht durch L-Citrullin, beobachtet worden (Griscavage et al. 1993; Hammermann et al. 1998). Vielmehr stellt die Induktion der iNOS-mRNA durch geeignete, teils spezie- oder zelltypspezifische Stimuli nicht nur die Voraussetzung für die Expression des Enzyms, sondern auch den grundlegenden Mechanismus der Regulation dar. iNOS-Expression kann in nahezu allen Zelltypen mit entsprechenden, häufig immunologisch aktiven Agenzien stimuliert werden. Murine Zellen exprimieren iNOS beispielsweise nach Inkubation mit LPS oder proinflammatorisch-stimulatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  (Kleinert et al. 2004). Hemmenden Einfluss auf diese Induktion üben hingegen Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4, IL-13 oder IL-10 aus (Schmidt 1994). Dies wurde unter anderem an der humanen Alveolarepithelzelllinie A549 gezeigt (Berkman et al. 1996).

Hingegen benötigt die Mehrzahl humaner Zellen zur iNOS-Induktion komplexe Kombinationen der oben genannten Zytokine (Kleinert et al. 2003). So existieren im humanen iNOS-Promotor überlappende Bindedomänen für NF $\kappa$ B und STAT 1, und für eine Promotoraktivierung scheint die Bindung beider Transkriptionsfaktoren erforderlich zu sein. Ferner sind AP 1-Bindedomänen sowohl mit positivem als auch mit negativ-regulatorischem Einfluss im humanen iNOS-Promotor lokalisiert (Korhonen et al. 2005). Über verstärkte Bindung der Transkriptionsfaktoren *CAAT/enhanced-binding protein* (C/EBP) und *cAMP-responsive-element-binding protein* (CREP) an den Promotor wurde nach Induktion der iNOS durch cAMP berichtet (Beck et al.



1999). Jedoch sind Signaltransduktionswege, die letztendlich zu einer Induktion der iNOS führen, zelltyp- und spezieabhängig (Kleinert et al. 2004).

Nicht zuletzt sind auch posttranskriptionelle Mechanismen kritisch in die Regulation der iNOS involviert (Kleinert et al. 2004). So ist für *Transforming-Growth-Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) an murinen Peritonealmakrophagen (Vodovotz et al. 1993) oder für Dexamethason an RAW 264.7 (Walker et al. 1997) eine Inhibition der iNOS beschrieben worden, die aus der Destabilisierung der iNOS-mRNA und der Degradation des Proteins selbst resultiert. Eine direkte Beeinflussung der iNOS findet lediglich im Rahmen der oben beschriebenen negativen Rückkopplung durch NO selbst statt.

Wie bereits erwähnt, verursacht die Induktion der iNOS eine lang anhaltende Phase ausgeprägter NO-Produktion, die sich nahezu vollständig einer Kontrolle auf dem Niveau der Enzymaktivität entzieht. Somit nimmt die Verfügbarkeit des Substrates *L*-Arginin eine entscheidende Rolle in NO-produzierenden Zellen ein und es erschließt sich die Möglichkeit einer Regulation der NO-Synthese über die Substratzufuhr. Diese limitiert sich durch Expression der CATs, durch Neusynthese und Recycling des *L*-Arginins sowie durch konkurrierende Stoffwechselwege einschließlich des Substratumsatzes durch die Arginase.

<b>Isoform</b>	<b>NOS I</b>	<b>NOS II</b>	<b>NOS III</b>
Synonym	nNOS (neuronal)	iNOS (induzierbar)	eNOS (endothelial)
erste Identifikation	Neuronen	Makrophagen	Endothelzellen
Proteingröße	150-160 kDa	125-135 kDa	135 kDa
subzelluläre Lokalisation (überwiegend)	löslich, zytosolisch	löslich, zytosolisch	membrangebunden
Expression	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Aktivierung	calciumabhängig	calciumunabhängig	calciumabhängig
NO-Synthese	low-output	high-output	low-output
Lokalisation im Respirationstrakt	inhibitorische nichtadrenerge-nichtcholinerge (iNANC) Nervenfasern im glatten Muskelgewebe	Makrophagen, Lungenfibroblasten, glatte Muskelzellen der Atemwege und Gefäße, Alveolar- und Bronchialepithelien, Endothelzellen	Bronchialendothel, Bronchialepithel, Alveolarepithel

**Tab.1:** Charakterisierung der NO-Synthasen

### 1.4.2 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist als vielseitiges inter- und intrazelluläres Signalmolekül an der Kontrolle zahlreicher Zell- und Organfunktionen des Körpers beteiligt, einschließlich der Lunge und der Atemwege. Das Wirkspektrum erstreckt sich von Funktionen als Neurotransmitter, Blutdruckregulation und Beeinflussung der Thrombozytenfunktion über immunologische Abwehrmechanismen bis hin zum Zellgift (Moncada und Higgs 1993). Dabei bestimmen Konzentration und physiologische Zielstruktur weitestgehend die Wirkqualität.

Als kleines, gasförmiges und ungeladenes Molekül zeichnet sich Stickstoffmonoxid durch hohe Diffusionsraten aus und ist mit einem ungepaarten Elektron im äußeren Orbital ein energiereiches, hochreaktives Radikal mit einer Halbwertszeit (HWZ) von ca. 15 sek. Neben NO sind zwei weitere biologisch aktive Redoxformen beschrieben worden:  $\text{NO}^-$  (Nitroxylanion) und  $\text{NO}^+$  (Nitrosoniumkation). Deren Oxidation führt zur Generierung weiterer NO-Spezies wie  $\text{NO}_2$  und  $\text{N}_2\text{O}_3$ , die ebenso als NO-Donatoren dienen können. In oxidativen Stresssituationen stehen Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ) als Reaktionspartner zu Verfügung und es entsteht das hochreaktive Oxidanz Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). In wässriger Lösung werden alle reaktiven NO-Spezies zu relativ stabilen und somit weniger reaktiven Nitrit- ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat- ( $\text{NO}_3^-$ ) Anionen oxidiert (Tuteja et al. 2004).

Die Aktivität des Stickstoffmonoxids beschränkt sich nicht auf den Ort seiner Entstehung oder auf einen spezifischen Rezeptor. Vielmehr stehen ihm diverse anorganische Moleküle (freie Sauerstoffradikale, Superoxidanionen oder Kationen der Übergangsmetalle), DNA-Strukturen (Pyrimidinbasen), prosthetische Gruppen (z.B. Häm) oder Proteine (Cysteinreste, freie Thiole) als Reaktionspartner zur Verfügung (Bogdan 2001).

In niedrigen Konzentrationen, die wie bereits erwähnt durch die beiden *low-output* NO-Synthasen nNOS und eNOS bereitgestellt werden, reagiert NO mit Übergangsmetallkationen zu Nitrosylkomplexen. Mehrheitlich finden diese Reaktionen mit Metalloproteinen statt, die Eisen, meist in Form von Häm, enthalten.

Zahlreiche physiologische Effekte von NO resultieren aus der Nitrosylierung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase. Das auf diese Weise aktivierte Enzym katalysiert die Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP; Ignarro 1990). Infolge dieser essentiellen

physiologischen Reaktion wird die Regulation von Ionenkanälen, Phosphodiesterasen und Proteinkinasen beeinflusst, die ihrerseits vielfältige physiologische Prozesse im kardiovaskulären wie auch im zentralen und peripheren neuronalen System vermitteln (Beck et al. 1999). An der glatten Muskulatur des Gefäßsystems führt ein cGMP-Anstieg beispielsweise zu einer Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration, Erschlaffung der Muskulatur, Erweiterung der Blutgefäße und letztendlich zum Blutdruckabfall. Aus dem Gefäßendothel freigesetztes NO diffundiert zudem ins Gefäßlumen und unterdrückt über cGMP-abhängige Mechanismen die Aggregation von Thrombozyten und deren Adhäsion an das Gefäßendothel (Tuteja et al. 2004).

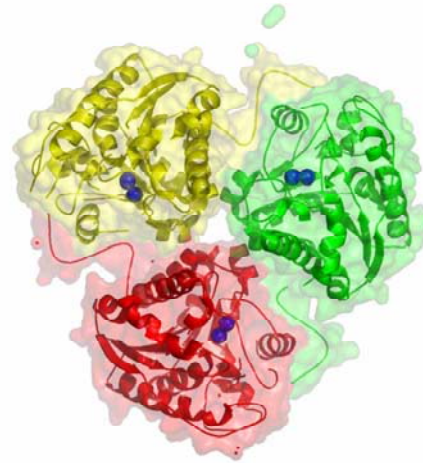
Ähnlich wie die Proteinphosphorylierung reguliert NO reversibel Proteinfunktionen durch posttranslationelle Modifikation von Cysteinthiolen mittels S-Nitrosylierung (Tuteja et al. 2004; Korhonen et al. 2005). S-Nitrosylierung kann durch direkte Interaktion mit NO oder durch frei zirkulierende S-Nitrosothiolderivate, wie beispielsweise S-Nitrosoglutathion, vermittelt werden, die mit einer HWZ von > 2 h wesentlich stabiler sind als freies NO, jedoch ähnliche Reaktionseigenschaften aufweisen. Sie stellen somit eine Art Transportform dar (Clancy et al. 1998; Bogdan 2001).

Die Synthese von Stickstoffmonoxid als Mechanismus der unspezifischen Immunabwehr erfolgt erst nach Induktion der Genexpression der *high-output* NO-Synthase iNOS durch inflammatorische Agenzien. Nach dieser Aktivierung sind Makrophagen und Granulozyten als klassische Zellen der Immunabwehr in der Lage, große Mengen NO zu produzieren. Dies gelangt durch Diffusion in die umliegenden Gewebe und führt dort, beispielsweise durch Reaktion mit Eisen- und Schwefel-Zentren wichtiger Makromoleküle, zur Abtötung von Bakterien, Pilzen, Viren und weiteren Pathogenen. In Tumorzellen wirkt NO auf diese Weise zytotoxisch und proliferationshemmend. Wird unter inflammatorischen oder infektiösen Konditionen iNOS langfristig induziert, führt das in großen Mengen freigesetzte NO zu nekrotischen bzw. fibrotischen Gewebeschäden und trägt somit zur Symptomatik der Erkrankung bei. Darüber hinaus sind zahlreiche andere Zelltypen durch gesteigerte NO-Produktion an Immunreaktionen beteiligt, wie beispielsweise glatte Muskelzellen, Epithel- und Endothelzellen oder auch Fibroblasten (Bogdan 2001).

Auf diese Weise ist NO an zahlreichen Entzündungsprozessen und der Symptomatik von rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen oder *Asthma bronchiale* beteiligt (Hobbs et al. 1999).



Als Reaktionsmechanismus für die Hydrolyse des *L*-Arginins wird ein nukleophiler Angriff dieses Mangan-aktivierten Hydroxidions am Guanidin-Kohlenstoff des Substrats, darauf folgender Protonentransfer und anschließende Dissoziation der Produkte postuliert. Dabei gilt für die meisten Vertreter dieser Enzymfamilie ein ähnliches pH-Optimum mit maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten bei pH 9-9,5 (Ash 2004; Kanyo et al. 1996). Neben ihrer katalytischen Funktion tragen die gebundenen Manganionen zur Stabilität der Tertiärstruktur des Proteins bei, für die eine Kombination aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern beschrieben wurde. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte nach langjähriger kontroverser Diskussion für die Quartärstruktur das Modell aus Homotrimeren bestätigt werden (Kanyo et al. 1992; Kanyo et al. 1996):



**Abb. 4:** Ribbon-Strand Modell der *Rattus Norvegicus* Arginase I (im Hintergrund van der Waals-Modell). Die drei identischen Monomere des Arginase-Komplexes sind in grün, gelb und rot dargestellt, in blau die Manganionen.

### 1.5.1 Arginase-Isoenzyme

Bislang wurden im Säugetierorganismus zwei Isoenzyme identifiziert, die von zwei verschiedenen Genen kodiert werden, sich hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften jedoch kaum voneinander unterscheiden. Bezüglich immunologischer und molekularer Eigenschaften sowie ihrer zellulären Kompartimentierung und Gewebeverteilung lassen sie sich hingegen eindeutig differenzieren (Wu und Morris, Jr. 1998).

#### *Arginase I (hepatische oder Leber-Typ-Arginase)*

Bei der Arginase I handelt es sich um ein zytosolisches Enzym. Es wird überwiegend in der Leber exprimiert und stellt hier das finale Enzym des Harnstoffzyklus dar. In anderen Geweben findet es sich nur in begrenztem Umfang (Wu und Morris, Jr.

1998). Allerdings wurde die Arginase humaner Erythrozyten auch als Leber-Typ-Arginase identifiziert (Iyer et al. 1998).

Das humane Arginase I-Gen ist ca. 12 kb lang, enthält acht Exons und ist auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q23) lokalisiert (Takiguchi et al. 1988; Sparkes et al. 1986). Analog hierzu ist das entsprechende Gen der Ratte strukturiert (Ohtake et al. 1988). Die cDNA kodiert für 324 Aminosäuren, woraus ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 35 kDa resultiert (Iyer et al. 1998). Sequenzvergleiche der cDNA verschiedener Spezies zeigten extrem hohe Homologien in sechs konservierten Regionen, die unter anderem die Konservierung aller an der Bindung des Kofaktors beteiligten Aminosäuren beinhalten. Ein Vergleich der kompletten Aminosäuresequenz zwischen Ratte und Mensch führt zu 86%iger Homologie (Perozich et al. 1998).

Wie bereits erwähnt wird das Arginase I-Gen in höchstem Maße in der Leber exprimiert. mRNA-Level werden durch Proteinaufnahme über die Nahrung beträchtlich erhöht; ein Effekt, der vermutlich durch Glukagon und Glucocorticoide vermittelt wird und mit der Induktion weiterer Enzyme des Harnstoffzyklus einhergeht (Morris, Jr. et al. 1997; Takiguchi et al. 1988).

Sequenzvergleiche zwischen Ratte und Mensch zeigten eine 87%ige Homologie der 5'-UTR von ca. 100 bp. Experimente an Deletionsmutanten dieser Region gaben Hinweise auf das Vorkommen von Elementen zur effizienten Transkriptionsregulation in diesem Bereich (Takiguchi und Mori 1991). Beide Spezies zeigen in den proximalen Promotorregionen charakteristische TATA- und CAAT-Boxen, währenddessen jeweils drei Konsensussequenzen für *glucocorticoid responsive elements* (GRE) weiter *upstream* lokalisiert sind (Takiguchi et al. 1988; Ohtake et al. 1988). Allerdings wurde gezeigt, dass die durch Glucocorticoide angeregte Transkription nicht über GRE sondern durch Induktion des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  vermittelt wird (Mori 2007). Neben zwei C/EBP-Bindedomänen weist die Promotorregion der Ratte teils überlappende Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren CTF/NF 1 und SP 1 auf (Takiguchi und Mori 1991). C/EBP $\beta$  verursacht eine Aktivierung des Promotors, die durch den Transkriptionsfaktor HNF 4 nach Angriff an derselben Bindedomäne reprimiert wird. Hierdurch wird eine Feinregulation der Promotoraktivität erreicht (Chowdhury et al. 1996; Mori 2007). Die 5'-UTR der humanen Arginase I enthält einen Sequenzabschnitt mit Eigenschaften eines *cAMP responsive elements* (CRE) neben einer Konsensussequenz für CTF/NF 1 als CAAT-

*box recognizing protein* (Takiguchi et al. 1988). Als Mechanismus zur makrophagen-spezifischen Arginase I-Expression wurde ca. 3000 bp vor dem Transkriptionsstart ein STAT 6-Motiv identifiziert, welches entweder direkt oder in Kombination mit zahlreichen weiteren Faktoren, wie beispielsweise C/EBP $\beta$ , ein Enhancer-Element aktiviert (Pauleau et al. 2004; Gray et al. 2005).

#### *Arginase II (extrahepatische Arginase)*

Die Arginase II ist in den Mitochondrien zahlreicher Zellen lokalisiert, die nicht die vollständige Enzymausstattung des Harnstoffzyklus besitzen. Aus diesem Grund wird die extrahepatische Arginase eher als regulatorisches Enzym betrachtet, im Hinblick auf NO- und Ornithinsynthese, denn als kataboles Enzym im Verlauf des Harnstoffzyklus (Jenkinson et al. 1996). Ihr Expressionsmuster erstreckt sich über diverse Gewebe- und Zelltypen, wie beispielsweise Niere, Prostata, Dünndarm, Gehirn, Skelettmuskel, Makrophagen und Endothelzellen. In der Leber hingegen wird Arginase II nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert (Wu und Morris, Jr. 1998). Des Weiteren unterliegen beide Isoenzyme einer entwicklungspezifischen Regulation, da sich beispielsweise im fetalen Leber- (Arginase I), Nieren- und Lungengewebe (Arginase II) nur sehr geringe mRNA-Level detektieren lassen (Gotoh et al. 1997).

Das humane Arginase II-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 14 (14q24.1-24.3; Gotoh et al. 1997). Hinsichtlich der von acht Exons bestimmten Exon-Intron-Struktur zeigten sich anhand der murinen Arginase II große Übereinstimmungen mit Arginase I-Genen (Shi et al. 1998). Die mitochondriale Lokalisation wird durch eine zusätzliche N-terminale Importsequenz vermittelt (Morris, Jr. et al. 1997). Die cDNA kodiert für 354 Aminosäuren, aus denen sich ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 40 kDa errechnet (Iyer et al. 1998). Wie schon bei der Arginase I zeigt der Sequenzvergleich sechs konservierte Regionen und ca. 88% Homologie zwischen Ratte und Mensch sowie ca. 93% Homologie zwischen Ratte und Maus. Ein Vergleich der beiden Isoenzyme der jeweiligen Spezies führt lediglich zu einer ca. 52%igen Homologie (Perozich et al. 1998).

Auch eine Gegenüberstellung der Promotorregionen beider Isoenzyme weist keine Analogie auf. Im murinen Arginase II-Promotor konnten potentielle Bindungsstellen für AP 1, NF $\kappa$ B und ein CRE identifiziert werden, doch existieren weder TATA- noch CAAT-Box (Shi et al. 1998).

<b>Isoform</b>	<b>Arginase I</b>	<b>Arginase II</b>
Proteingröße	35 kDa 324 Aminosäuren	40 kDa 354 Aminosäuren
Quartärstruktur	Trimer	Trimer
$K_m$ (L-Arginin)	5-9 mM	7 mM
pH-Optimum	9,7-9,9	9,4-10,0
Kofaktor	$Mn^{2+}$	$Mn^{2+}$
Inhibitor	$N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin	$N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin
subzelluläre Lokalisation	Zytosol	Mitochondrialmatrix
Gewebelokalisation	Leber humane Erythrozyten	Niere, Prostata, Dünndarm, Gehirn

**Tab. 2:** Charakterisierung der Arginase-Isoenzyme (nach Mori 2007)

Die Anpassung der Arginase-Enzymkapazität erfolgt grundsätzlich auf Transkriptionsebene. Darüber hinaus können Schwankungen in der Konzentration des Kofaktors  $Mn(II)$  die Arginaseaktivität modifizieren (Morris, Jr. 1992). Die Regulation der Arginase I im Kontext des Harnstoffzyklus ist an die metabolischen Erfordernisse im Gesamtorganismus gekoppelt und wird weitgehend durch den Proteingehalt der Nahrung oder durch hormonelle Faktoren wie Glukagon, Schilddrüsenhormone, Glucocorticoide oder zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) gesteuert (Jenkinson et al. 1996; Morris, Jr. 1992). Die Expression extrahepatischer Arginase I und Arginase II wird in verschiedenen Zelltypen durch vielfältige Stimuli, wie beispielsweise  $Th_2$ -Zytokine (IL-4 und IL-13), TGF- $\beta$ , Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) und cAMP-Aktivatoren sowie deren Kombination, reguliert (Boutard et al. 1995; Wei et al. 2000; Klasen et al. 2001; Lindemann und Racké 2003; Corraliza et al. 1995). Untersuchungen des Mechanismus der positiven Regulation der Arginase I durch IL-4 und IL-13 an glatten Gefäßmuskelzellen zeigte die Beteiligung des JAK/STAT- und des cAMP/Proteinkinase A (cAMP/PKA)-Signaltransduktionsweges (Wei et al. 2000). Die Bedeutung der cAMP/PKA-Kaskade für die Hochregulation der Arginaseaktivität konnte sowohl für Alveolarmakrophagen des Kaninchens (Hammermann et al. 2000b) als auch für die murine Makrophagenzelllinie J774



(Chang et al. 2000) bestätigt werden. Ferner deutete in dieser Studie vieles auf eine parallele Beteiligung der p38 MAPK-Signalkaskade.

Während die hepatische Arginase als finales Enzym des Harnstoffzyklus höherer Säugetiere der Ammoniakentgiftung dient, ist der physiologische Effekt der extrahepatischen Arginase I und Arginase II noch nicht abschließend geklärt. In den Zellen extrahepatischer Gewebe, die nicht über die komplette Enzymausstattung des Harnstoffzyklus verfügen, wird der Arginase eher ein anaboler denn kataboler Charakter zugeschrieben. Da Arginase-Isoenzyme in verschiedenen Kompartimenten mit unterschiedlichen Enzymen kolokalisiert vorliegen, ergeben sich hieraus evtl. Anhaltspunkte für die Funktion extrahepatischer Arginase im Arginin-metabolismus (Iyer et al. 1998).

### **1.5.2 Arginase und Polyaminsynthese**

Wie bereits mehrfach erwähnt katalysiert die Arginase den Umsatz von *L*-Arginin zu *L*-Ornithin und Harnstoff. In der nachfolgenden Umsatzreaktion entsteht unter Katalyse des im Zytosol lokalisierten Enzyms Ornithindecaboxylase (ODC) aus *L*-Ornithin Putrescin und CO<sub>2</sub>. In der Folge dient Putrescin mit S-Adenosylmethionin als Substrat für die Synthese von Spermidin durch die Spermidinsynthase und weiter zu Spermin durch die Sperminsynthase (siehe *Abb. 1*; Thomas und Thomas 2001).

#### *Polyamine*

Putrescin, Spermidin und Spermin sind erforderliche Komponenten für den Ablauf des Zellzyklus und spielen als solche eine wichtige Rolle in der Zellproliferation. Aber auch ihre Fähigkeit, Interaktionen zwischen DNA und DNA-assoziierten Proteinen sowie Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen, verdeutlicht ihren physiologischen Einfluss auf zelluläre Abläufe wie Zellwachstum, -teilung und -differenzierung (Thomas und Thomas 2001).

Es handelt sich hierbei um aliphatische Di- (Putrescin) bzw. Oligoamine (Spermidin, Spermin), die unter physiologischen pH-Bedingungen positive Ladungen tragen. Somit sind sie sehr gut wasserlöslich, können in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vorliegen und besitzen eine hohe

Affinität zu negativ geladenen zellulären Molekülen. In der Folge treten starke Kation-Anion-Interaktionen mit Makromolekülen, wie z.B. DNA oder RNA, auf (Hoet und Nemery 2000). Dies führt zur Stabilisierung doppelsträngiger DNA. Außerdem wird auf diese Weise der wechselnde Kondensationsstatus der DNA während aufeinander folgender Zellzyklusphasen u.a. durch Polyamine beeinflusst. Des Weiteren können Polyamine Konformationswechsel bestimmter DNA-Sequenzen begünstigen und demzufolge die Zugänglichkeit von Bindungsdomänen modifizieren (Thomas und Thomas 2001). So wurde beispielsweise an Brustkrebszellen in Anwesenheit von 1-2 mM Spermin eine sechsfach erhöhte Affinität des Transkriptionsfaktors NFκB an sein *DNA response element* (NRE) beobachtet (Shah et al. 1999).

Ornithindecaboxylase (ODC) wird in der Literatur als das erste geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Polyaminsynthese beschrieben (Wu und Morris, Jr. 1998). Da sowohl ODC als auch Arginase I im Zytosol vorliegen, kann durch Arginase I generiertes *L*-Ornithin leicht zur Polyaminsynthese genutzt werden (Li et al. 2001). Hingegen ist der Beitrag der Arginase II zur Polyaminsynthese nicht so leicht ersichtlich. Jedoch konnte an Enterozyten gezeigt werden, dass auch in Mitochondrien erzeugtes *L*-Ornithin als Substrat für die zytosolische Polyaminsynthese dienen kann (Wu et al. 2000). Des Weiteren zeigten Arginase I- oder Arginase II-transfizierte Endothelzellen, dass eine Überexpression beider Isoenzyme den Putrescin- und Spermidin Gehalt der Zellen erhöht (Li et al. 2001) bzw. Arginase I-transfizierte glatte Muskelzellen der Rattenaorta erhöhte Proliferationsraten aufweisen (Wei et al. 2001). Ebenso führte an aktivierten, Arginase I-transfizierten Mausmakrophagen der Zelllinie RAW 264.7 eine erhöhte Expression der Arginase I zu einer Stimulation der Putrescin- und Spermidinsynthese (Kepka-Lenhardt et al. 2000). Somit könnte der Einfluss der Arginase auf die Zellproliferation in Wundheilungs- und Entzündungsprozessen sowie Angiogenese oder Atherosklerose möglicherweise eine wichtige Rolle spielen.

Ob die Arginase neben der ODC hingegen auch als limitierender Faktor der Polyaminsynthese dient, ist umstritten und soll in der vorliegenden Arbeit an primären Atemwegsfibroblasten der Ratte näher beleuchtet werden.

### 1.5.3 Arginase und Prolinsynthese

Das zweite wichtige Enzym, über welches die Aminosäure *L*-Ornithin verstoffwechselt wird, stellt die Ornithinaminotransferase (OAT) dar, die im Mitochondrium lokalisiert ist. OAT katalysiert die Umsatzreaktion des *L*-Ornithins zu *L*-Pyrrolin-5-carboxylat (P5C), welches anschließend durch die ebenfalls mitochondrial positionierte P5C-Dehydrogenase zu Glutamat oder durch die zytosolische P5C-Reduktase zu *L*-Prolin metabolisiert wird (Wu und Morris, Jr. 1998). *L*-Prolin dient als essentielles Substrat zur Synthese des Strukturproteins Kollagen.

#### *Kollagen*

Kollagen ist das strukturgebende Protein des Bindegewebes bzw. der extrazellulären Matrix (ECM) und stellt als solches das meist verbreitete Protein höherer Organismen dar (Trackman 2005).

Während der komplexen Biosynthese des Kollagens bildet sich zunächst ein trimeres Molekül, in dem jeder Strang aus dem sich wiederholenden Triplet Gly-X-Y besteht. An Position X findet sich häufig *L*-Prolin und an Position Y Hydroxyprolin, so dass sich die Primärstruktur durch das sich wiederholende Sequenzmotiv Glycin-Prolin-Hydroxyprolin charakterisieren lässt. Hieraus resultiert untypischerweise eine stabile linksgedrehte Konformation. Drei dieser Helices lagern sich zu einer rechtsgängigen Superhelix zusammen, in der die Glycinreste jeweils zur Mitte der Helix weisen (Ottani et al. 2002; Vakonakis und Campbell 2007). Die posttranslationale Hydroxylierung der Prolinreste zu Hydroxyprolin trägt hier zur Stabilisierung der Konformation bei (Trackman 2005). Dieses Prokollagen wird in den Extrazellularraum sezerniert und die Propeptide proteolytisch gespalten. Im Resultat lagern sich die entstandenden tripelhelicalen Kollagenmoleküle spontan zu hochorganisierten Strukturen, wie beispielsweise Fibrillen oder Netzen, zusammen, die sich durch extreme Zugfestigkeit auszeichnen und somit die Stabilität des Bindegewebes gewährleisten (Canty und Kadler 2005; Trackman 2005).

Bislang sind 28 Kollagentypen bekannt, die nach ihrer Gewebelokalisation, ihrer molekularen Struktur (homo- oder heterohelical), nach ihrem

Aggregationsverhalten im Extrazellularraum und ihrer Funktion unterschieden werden (van der Rest und Garrone 1991).

Fibrilläres Kollagen, zu dem das Kollagen 1 zählt, wird überwiegend von spezialisierten Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, produziert und sezerniert, *in vivo* ebenso wie in der Zellkultur. Über die Art und Weise der Regulation und Kontrolle dieser Prozesse, insbesondere während der embryonalen Entwicklung, Geweberegeneration und Wundheilungsprozessen, ist jedoch noch relativ wenig bekannt (Canty und Kadler 2005).

Die Funktion der Aminosäure *L*-Arginin als Ausgangspunkt der Prolinsynthese respektive der Kollagensynthese begründet die Frage nach der Rolle der Arginase an diesem Stoffwechselweg und somit am Wundheilungsgeschehen, an Remodellingprozessen und an fibrotischen Veränderungen verschiedener Gewebe. Bereits vor dreißig Jahren wurde demonstriert, dass *L*-Arginin-defiziente Ratten verschlechterte Wundheilung, begleitet von geringer Kollagendeposition und schwacher Zugfestigkeit des neu gebildeten Gewebes, aufweisen (Seifter et al. 1978). Wunden und andere Entzündungsherde mit starker Makrophageninfiltration wurden von Albina *et al.* durch Anwesenheit extrazellulärer Arginase charakterisiert (Albina et al. 1993). Dementsprechend fanden sich geringe *L*-Arginin- und hohe *L*-Ornithinlevel im Wundsekret. Zusätzlich war die lokale Prolinsynthese unter diesen Umständen verstärkt. Dies wurde als vorteilhaft gewertet, da die Prolinverfügbarkeit bei schneller Kollagenproduktion diese in ihrem Ausmaß limitiert. Jedoch konnten die Änderungen extrazellulärer Konzentrationsverhältnisse mit dem Ausmaß intrazellulärer Kollagenproduktion und -sekretion nicht vollständig in Einklang gebracht werden (Albina et al. 1993). Des Weiteren zeichneten sich Wundfibroblasten der Ratte im Vergleich zu normalen Hautfibroblasten sowohl durch erhöhte Kollagensyntheseraten als auch durch erhöhte Arginaseaktivität aus, wobei ausschließlich Arginase I detektierbar war (Witte et al. 2002).

*Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ )-induzierte Kollagensynthese in glatter Gefäßmuskulatur der Ratte korrelierte mit erhöhter Arginase- und OAT-Aktivität sowie CAT-1-Expression, konnte durch selektive OAT-Inhibitoren wie *L*-Canalin

gehemmt werden und war somit vom Ausmaß der Prolininformation über OAT abhängig (Durante et al. 2001).

Außerdem ging in Endothelzellen die durch Transfektion erhöhte Expression von Arginase I oder Arginase II mit einer verstärkte Prolinproduktion einher (Li et al. 2001).

Somit scheint die Arginase in Zeiten hohen Kollagenbedarfs eine optimale Versorgung der Zelle mit *L*-Prolin zu gewährleisten. Aber auch hier stellt sich die Frage, ob die Funktion der Arginase für die Regulation dieser Prozesse essentiell ist.

#### **1.5.4 Arginase und NO-Synthese**

Zahlreiche Gewebe exprimieren neben Arginase I und/oder Arginase II NO-Synthasen. Hieraus ergibt sich eine Konkurrenzsituation um das gemeinsame Substrat *L*-Arginin und die damit verbundene Möglichkeit zur Regulation der NO-Synthese. Die Koinduktion extrahepatischer Arginase und NOS durch Stimuli, wie beispielsweise LPS (Wang et al. 1995; Sonoki et al. 1997), die Induktion der Arginase durch NOS-Inhibitoren (Corraliza et al. 1995; Louis et al. 1998) und die Ko- bzw. Kontraregulation durch Zytokine oder Intermediate beider Stoffwechselwege (Mori et al. 1998; Waddington et al. 1998) untermauern die Hypothese, dass Arginase durch Modulation der lokalen Argininkonzentration essentiell an der Regulation der NOS-Aktivität beteiligt sein könnte (Hey et al. 1997; Chang et al. 1998).

Ein Vergleich der Umsatzeigenschaften beider Enzymsysteme führt zu folgendem Ergebnis:

Der  $K_m$ -Wert der Arginase aus Säugerzellen für *L*-Arginin liegt organabhängig zwischen 2-20 mM (Grody et al. 1987), derjenige für verschiedene NOS beträgt jedoch 2-20  $\mu$ M (Griffith und Stuehr 1995; Reczkowski und Ash 1994). Andererseits ist die  $V_{max}$  der Arginase bei physiologischem pH ca. 1000fach höher als die der NOS, so dass bei niedriger Argininkonzentration und äquivalentem Expressionslevel effektiv ähnliche Substratumsatzraten resultieren. Jedoch ist bei hoher Substratkonzentration und relativ gesehen geringerem NOS-Level, ein bevorzugter Umsatz durch die Arginase und somit eine Limitierung der Substratverfügbarkeit für die NO-Synthese zu erwarten (Wu und Morris, Jr. 1998).

Vor dem Hintergrund der geschilderten zytotoxischen Eigenschaften von NO gegenüber Krankheitserregern und der Beteiligung von Arginase-Produkten wie L-Prolin und Polyaminen an zellulären Reparaturmechanismen wird dem Argininstoffwechsel eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen zugeschrieben, wobei bisher überwiegend die Verhältnisse in Makrophagen im Mittelpunkt des Interesses standen (Shearer et al. 1997; Ash 2004). Im Expressionsmuster der beteiligten Enzymsysteme wurden jedoch in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe, dem Aktivierungsstatus der Zellen und nicht zuletzt der untersuchten Spezies starke Variabilitäten beobachtet:

iNOS und Arginase II wurden koinduziert in unstimulierten und LPS-aktivierten murinen Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 (Wang et al. 1995; Morris, Jr. et al. 1998). Hingegen wurden in Peritonealmakrophagen der Ratte und *in vivo* in der Rattenlunge nach LPS-Behandlung Arginase I, nicht Arginase II, mit iNOS koinduziert (Sonoki et al. 1997). In LPS-aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus wurden neben iNOS sowohl Arginase II als auch in späterer Phase Arginase I induziert (Salimuddin et al. 1999). Demnach scheint in diesem System durch Steigerung der Arginase II-Aktivität die Bereitstellung von L-Ornithin respektive L-Prolin und Polyaminen zur Deckung des erhöhten Bedarfs im Wundheilungsgeschehen gewährleistet zu sein. Ferner wird durch iNOS-Aktivierung die erforderliche Abwehrleistung sichergestellt. Da sich NO-Überproduktion sowohl auf Makrophagen als auch auf benachbarte Zellen toxisch auswirken könnte, läge mit der späteren Expression der Arginase I-Isoform ein Mechanismus vor, um anhaltender NO-Überproduktion entgegenzuwirken (Mori 2007).

Parallel hierzu wurde für verschiedene Modelle inflammatorischer Prozesse, wie beispielsweise der Wundheilung (Albina et al. 1990), Psoriasis (Bruch-Gerharz et al. 2003) oder Glomerulonephritis (Waddington und Cattell 2000), ein übereinstimmendes Zeitprofil des Argininstoffwechsels mit initialer Hochregulation der NO-Synthese, gefolgt von einem Übergang zur vorrangigen Nutzung des Arginaseweges, geschildert. Dementsprechend konnten die beschriebenen Beobachtungen an Makrophagenpopulationen auf vergleichbare Art und Weise in anderen Zellsystemen, wie beispielsweise Endothelzellen (Buga et al. 1996; Li et al. 2001) und Keratinozyten diabetischer (Kampfer et al. 2003) oder psoriatisch (Bruch-Gerharz et al. 2003) beeinflusster Wundheilungsprozesse, bestätigt werden.

Weitere Argumente für die Beteiligung des Argininstoffwechsels an Entzündung und Wundheilung lieferten auch Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe an primären Atemwegsfibroblasten der Ratte, die die reziproke Regulation von Arginase und iNOS durch die Th<sub>2</sub>-Zytokine IL-4 und IL-13 zeigten. Die erhöhte Arginaseaktivität war hierbei empfindlich gegen Glucocorticoide, wohingegen die Hemmung der iNOS-Expression unbeeinflusst blieb (Lindemann und Racké 2003; Lindemann et al. 2004).

Bei näherer Betrachtung lassen sich Wechselwirkungen zwischen den beiden Stoffwechselwegen jedoch nicht ausschließlich über die Substratkompetition erklären. Vielmehr eröffnet sich darüber hinaus eine komplexe wechselseitige Beeinflussung beider Enzymsysteme:

N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin (NOHA), ein Intermediat in der Biosynthese des NO (Kerwin, Jr. et al. 1995), stellt einen kompetitiven Inhibitor der Arginase dar (Boucher et al. 1994; Daghigh et al. 1994) und verdeutlicht als solcher die gegensätzliche Beziehung der beiden Enzyme im Argininkatabolismus (Cox et al. 2001). Erhebliche Mengen dieses Intermediates wurden im Medium LPS-behandelter Alveolarmakrophagen der Ratte (Hecker et al. 1995) und in Endothelzellen der Rattenaorta (Buga et al. 1996) nachgewiesen, so dass NOHA-vermittelte Inhibition der Arginase ausreichende Verfügbarkeit des L-Arginins für eine *high-output* NO-Produktion sicherstellen dürfte. In diesem Zusammenhang ermöglichte die Entwicklung synthetischer Arginaseinhibitoren wie N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-arginin (norNOHA) und S-(2-boronoethyl)-L-cystein (BEC) die nähere Analyse der physiologischen Beziehung zwischen Arginase und NO-Synthase einschließlich der Regulation NO-abhängiger Mechanismen. norNOHA ist ca. 40fach potenter bezüglich der Arginaseinhibition und ist weder Substrat noch Inhibitor der iNOS (Tenu et al. 1999). Bei BEC handelt es sich unter physiologischen pH-Bedingungen um einen potenten kompetitiven Inhibitor beider Arginaseisoenzyme (Colleluori und Ash 2001; Kim et al. 2001).

Im Gegenzug dazu inhibiert das Polyamin Spermin als Endprodukt der Argininverstoffwechslung über Arginase die Transkription der iNOS (Szabo et al. 1994; Mössner et al. 2001).

Über das Verständnis des Argininstoffwechsels hinaus erschließt sich in Untersuchungen zur Prävention der NO-vermittelten Apoptose (Gotoh und Mori 1999) oder der Zytotoxizität gegen Tumorzellen (Chang et al. 2001) die pathophysiologische

Bedeutung des regulatorischen Potentials der Arginase. Eine Verschiebung des Gleichgewichts im Argininstoffwechsel zugunsten des Arginaseweges wird als Ursache klinischer Krankheitsbilder diskutiert, die mit einem punktuellen NO-Mangel einhergehen. Hierzu zählen beispielsweise die erektile Dysfunktion (Cox et al. 1999), schwere Depressionen (Elgun und Kumbasar 2000), endotheliale Dysfunktion und cardiovasculäre Fehlfunktionen (Durante et al. 2007) sowie die Hyperreaktivität der Atemwege (Ricciardolo et al. 2005).



## **2 Pathophysiologische Bedeutung der Arginase bei *Asthma bronchiale***

Im Respirationstrakt wurde Arginase sowohl im Lungengewebe (Que et al. 1998b; Carraway et al. 1998; Meurs et al. 2002) als auch in verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise Alveolarmakrophagen (Hey et al. 1995; Klasen et al. 2001), Fibroblasten (Lindemann und Racké 2003) und Epithelzellen (Endo et al. 2003), nachgewiesen. In den Atemwegen von Asthmapatienten, sensibilisierten und allergenexponierten Mäusen und Meerschweinchen (Zimmermann et al. 2003; Meurs et al. 2002) und Patienten mit Cystischer Fibrose (Grasemann et al. 2005) wurden entsprechend erhöhte Arginaselevel festgestellt. Zudem wurde kürzlich beschrieben, dass der Arginaselevel in den Atemwegen von Asthmapatienten, die rauchen, verglichen mit Nichtrauchern deutlich höher liegt (Bergeron et al. 2007).

2003 ermöglichte die Durchführung von Microarray-Experimenten an Lungengewebe durch Zimmermann *et al.*, eine nicht unbeträchtliche Anzahl „Asthma-Signatur-Gene“ zu identifizieren. Anhand zweier muriner Asthmodelle wurde im Lungengewebe die Überexpression von Genen, die an der Kinetik der basischen Aminosäure *L*-Arginin und hier besonders an deren Verstoffwechslung über Arginasen beteiligt sind, erkannt. Hierzu zählten Arginase I, Arginase II und der Arginintransporter CAT-2. Hingegen zeigten AS, ODC und OAT ebenso wie eNOS, iNOS und nNOS keine signifikanten Änderungen in der Expression. Intrazelluläres *L*-Arginin ist als Ausgangspunkt der Synthese verschiedener Stoffwechselprodukte von großer Wichtigkeit, inklusive NO-, Polyamin- und Prolinproduktion. Diese Produkte sind kritisch in Asthma-assoziierte Prozesse involviert, so beispielsweise in der Regulation des Bronchialtonus, des Zellwachstums und der Kollagensynthese (Zimmermann et al. 2003).

*Asthma bronchiale* ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die unabhängig vom Schweregrad durch bronchiale Überempfindlichkeit (Hyperreagibilität) und Entzündung der Atemwege mit strukturellen Umbauprozessen (Remodeling) charakterisiert ist. In der Folge kommt es zu variabler Atemwegs-

obstruktion. Die Limitierung des Atemflusses wird im Wesentlichen durch vier Mechanismen verursacht: akute Bronchokonstriktion, Ödeme und Schwellung der Atemwegswände, Verlegung der Atemwege durch ein hochvisköses Sekret und bindegewebiger Umbau der Atemwege.

Die Prävalenz des Asthma ist in den vergangenen Jahrzehnten in vielen Ländern stark gestiegen und erreichte in der Altersgruppe über 18 Jahren in Deutschland im Jahr 2007 5,7% (Hoffmann 2007). In den westlichen Industriestaaten hat sich die Inzidenz seit 1980 nahezu verdoppelt (Umetsu et al. 2002). Einige Studien zur Asthmaprävalenz deuten jedoch an, dass die Zunahme asthmatischer Erkrankungen in westlichen Ländern zum Stillstand zu kommen scheint (Weiland und Pearce 2004).

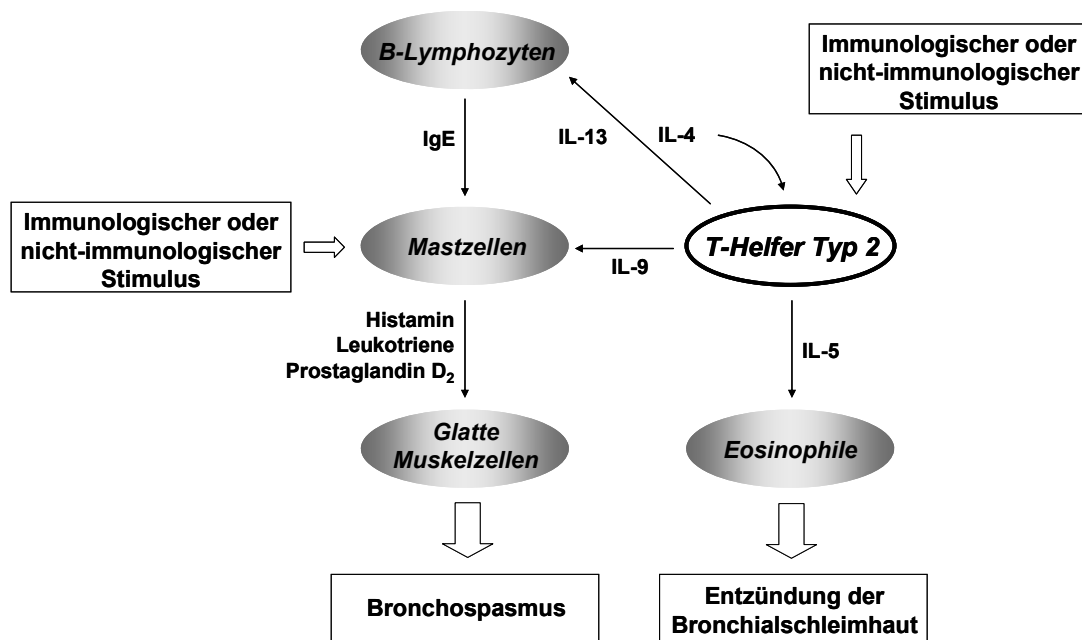
Die spezifischen Bedingungen, die zur Entwicklung des *Asthma bronchiale* führen, sind bis heute weitgehend unbekannt. Allerdings wird in genetisch prädisponierten Personen durch Umweltfaktoren, wie Allergenexposition oder Infektionen, die charakteristische Pathophysiologie asthmatischer Vorgänge ausgelöst (Bousquet et al. 2000; Malerba und Pignatti 2005). In diesem Zusammenhang wurden zwei *single nucleotid polymorphisms* (SNPs) in der Arginase II-Gensequenz mit dem Risiko einer Asthmaerkrankung im Kindesalter assoziiert (Li et al. 2006).

Die Entzündungen der Atemwege bei *Asthma bronchiale* ist ein multizellulärer Prozess, der zu Hyperreagibilität der Atemwege (AHR) führt. Die AHR ist definiert als „ansteigende Bronchokonstriktion in Reaktion auf einen unspezifischen Stimulus“ (Ricciardolo et al. 2004) und stellt zunächst eine akute und reversible Verengung der Atemwege dar. Langfristig kommt es jedoch zu chronischen Veränderungen des Gewebes, der sogenannten subepithelialen Fibrose, die durch Zell- und Gewebevermehrung, folglich durch Verengung und Elastizitätsverlust zu irreversiblen Funktionseinschränkungen führt.

## 2.1 Entzündliche Prozesse

Die zelluläre Charakteristik der Entzündungsvorgänge im Asthmageschehen ist die Infiltration der Wände der Atemwege mit Eosinophilen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Des Weiteren finden sich Mastzellen, Makrophagen und Neutrophile. Im verstärkt gebildeten Bronchialsekret sind Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophile und teilweise Neutrophile identifizierbar (Saetta und Turato 2001). Im Mittelpunkt steht eine Dysregulation der T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th<sub>2</sub>)-vermittelten Immunantwort, welche zu einer Überproduktion der Interleukine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 führt. Diese Th<sub>2</sub>-Zytokine fördern die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und die IgE-Produktion durch B-Zellen (siehe Abb 5; Bousquet et al. 2000; Barnes 2008). Anhand eines Mausmodells konnte bestätigt werden, dass die Aktivierung von Th<sub>2</sub>-Zellen durch Inhalation von Antigenen in den Atemwegen sowohl zu Eosinophilie und AHR als auch zu starker Mucussekretion führt (Cohn et al. 1998). Die Entstehung, Reifung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten wird maßgeblich durch IL-5 beeinflusst (Hamelmann und Gelfand 2001). Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung eines Antikörpers gegen IL-5, der die Eosinophilie nach Th<sub>2</sub>-Zell-Aktivierung im Blut und in Bronchoalveolarlavagen (BAL), jedoch nicht im Gewebe der Atemwege, deutlich reduzierte (O'Byrne 2006).

Die IFN- $\gamma$ -produzierenden Th<sub>1</sub>-Zellen werden als Gegenspieler der IL-4-produzierenden Th<sub>2</sub>-Zellen betrachtet. Deshalb wurde ihnen eine entscheidende protektive Rolle im Asthmageschehen zugesprochen (Wills-Karp 1999). Diese Ansicht ist jedoch umstritten (Hansen et al. 1999). Th<sub>1</sub>-Zellen sezernieren vorwiegend Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). IL-12, das vorwiegend von Makrophagen und Dendriten freigesetzt wird, fördert die Differenzierung von Th<sub>1</sub>-Zellen und ist, wie auch IFN- $\gamma$ , ein negativer Regulator der Th<sub>2</sub>-Differenzierung. IL-4 hingegen hemmt die Differenzierung naiver T-Vorläuferzellen zu Th<sub>1</sub>-Lymphozyten und fördert die Bildung von Th<sub>2</sub>-Zellen (Toews 2001). Weiterhin begünstigt IL-4 das Wachstum von Mastzellen und die Einwanderung von Eosinophilen in das Lungenepithel. Es aktiviert B-Zellen, fördert unter anderem die Synthese von IgE und stimuliert die Becherzellen zur Produktion eines zähen Bronchialsekrets (Kips 2001).



**Abb. 5:** Immun- und Entzündungskaskade bei Asthma bronchiale

Th<sub>2</sub>-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der entzündlichen Immunantwort bei asthmatischen Vorgängen. IL-5 fördert die Anreicherung aktivierter eosinophiler Granulozyten in der Bronchialschleimhaut und somit die Entzündung. Die Freisetzung von IL-4 und IL-13 stimuliert B-Zellen zur Synthese von IgE-Antikörpern. IL-9 stimuliert die Mastzellproliferation. Durch Degranulation der Mastzellen werden Histamin, Leukotriene und Prostaglandin D<sub>2</sub> freigesetzt, woraufhin glatte Muskelzellen kontrahieren und es zum Bronchospasmus kommt (modifiziert nach Barnes 2008).

Als dominierender Faktor für die Pathophysiologie des *Asthma bronchiale* wird jedoch IL-13 beschrieben. Es ist entscheidend für die Ausprägung von Eosinophilie und AHR und trägt ebenso wie IL-4 zur Ausschüttung des IgE bei. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-13 ein essentieller Faktor für die Induktion einer erhöhten Mucusproduktion ist. Ferner waren diese Effekte unabhängig von der Anwesenheit des IL-4, wurden jedoch über den gleichen Signaltransduktionsweg *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT 6) vermittelt (Wills-Karp et al. 1998; Kips 2001). Zahlreiche IL-4- oder IL-13-Effekte werden über Bindung an die IL-4R $\alpha$ -Kette und anschließender Induktion der Januskinase 1 (JAK) oder besonders STAT 6 vermittelt (Yang et al. 2001; Tomkinson et al. 2001).

Wie bereits in *Kapitel 1.5* dargelegt, werden beide Arginaseisoenzyme in verschiedenen Zelltypen durch Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4 oder IL-13 induziert, obgleich nur die

Arginase I-Induktion STAT 6-Abhängigkeit zeigte (Zimmermann et al. 2003). Darüber hinaus werden Arginase I und Arginase II konstitutiv in den Atemwegen exprimiert, besonders im Bronchialepithel und in Fibroblasten des peribronchialen Bindegewebes (Que et al. 1998b), und hier unter Entzündungsbedingungen durch Th<sub>2</sub>-Zytokine in ihrer Aktivität und Expression gesteigert (Lindemann und Racké 2003; Zimmermann et al. 2003). In diesem Zusammenhang lieferte kürzlich eine Studie an Mäusen von Yang *et al.* Hinweise auf die kritische Beteiligung der Arginase am Asthmageschehen, indem die Inhibition der Arginase I durch RNA-Interferenz die IL-13-induzierte AHR deutlich abschwächte (Yang et al. 2006).

## **2.2 NO in Asthma**

Die Pathophysiologie verschiedener Atemwegserkrankungen, wie beispielsweise Asthma, COPD, Cystische Fibrose und Pulmonale Hypertonie, wird unter anderem durch eine Verschiebung der NO-Homöostase charakterisiert, an deren Aufrechterhaltung alle drei NOS-Isoformen beteiligt sind (Ricciardolo et al. 2004).

In den Atemwegen wird cNOS überwiegend in inhibitorischen nichtadrenergen nicht-cholinergen (iNANC) Nerven (nNOS), im Endothel (eNOS) und im Atemwegsepithel (nNOS und eNOS) exprimiert und ist durch Produktion niedriger NO-Konzentration durch neurogene und nichtneurogene Stimuli vorrangig an der Regulation des Atemwegs- und Gefäßtonus beteiligt (Barnes und Belvisi 1993; Meurs et al. 2003). Mangelnde NO-Synthese durch cNOS trägt wesentlich zur Pathophysiologie des allergischen Asthmas bei (de Boer et al. 1996; Ricciardolo et al. 1997), indem das Fehlen des bronchodilatatorischen Agens NO die AHR verstärkt. Dieses Defizit ist auf eine Limitierung des cNOS-Substrates L-Arginin zurückzuführen (de Boer et al. 1999). Ursächlich liegen dieser Substratlimitation verschiedene Mechanismen zu Grunde: neben der Inhibition des zellulären L-Arginin-Uptakes über kationische Aminosäuretransporter (CAT, siehe *Kap. 1.2*) durch polykationische Proteine (Hammermann et al. 1999), könnte die reduzierte Substratverfügbarkeit in einer erhöhten Arginaseaktivität und einer daraus resultierenden Konkurrenzsituation begründet sein. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung unterstrichen, dass der Arginaseinhibitor norNOHA in einem Asthmodell an isolierten Tracheen des

Meerschweinchens die allergeninduzierte AHR verminderte, und dieser Effekt durch den NOS-Inhibitor N<sup>ω</sup>-Nitro-L-argininmethylester (L-NAME) aufgehoben wurde (Meurs et al. 2002).

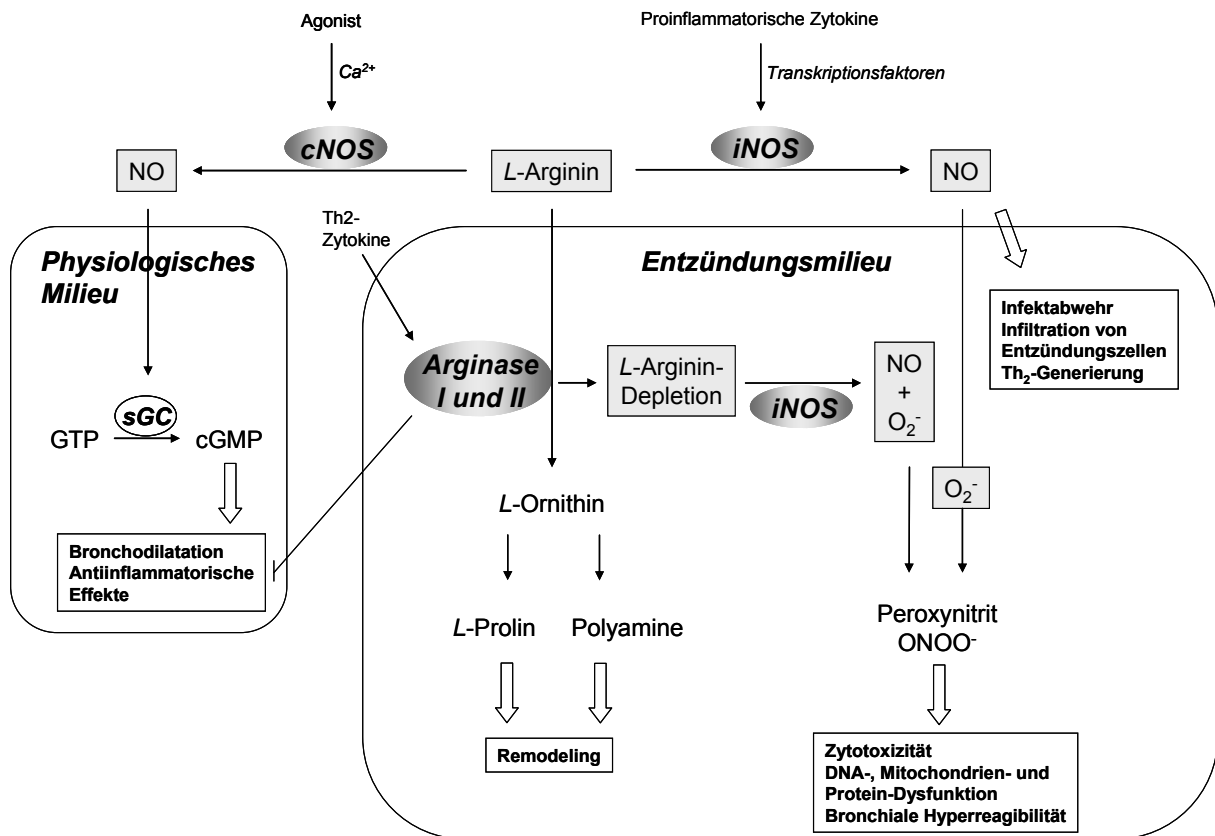
iNOS produziert NO in wesentlich größere Mengen als cNOS und wird durch proinflammatorische Zytokine im Verlauf asthmatischer Prozesse in verschiedenen Zellen der Atemwege, besonders in Epithel- und Entzündungszellen, einschließlich Makrophagen, Eosinophilen und Neutrophilen, induziert (Ricciardolo et al. 2006). Die gesteigerte iNOS-Expression korreliert ebenso wie die bronchiale Hyperreagibilität (Dupont et al. 1998) und die Anzahl eosinophiler Granulozyten im Sputum (Jatakanon et al. 1998) signifikant mit einer erhöhten NO-Konzentration in der Ausatemluft (Kharitonov et al. 1994). Basierend auf diesen Beobachtungen ist die NO-Konzentration im Atem ein brauchbarer Marker für den Entzündungsstatus im Verlauf asthmatischer Prozesse (Ricciardolo et al. 2004).

Des Weiteren scheint die iNOS entsprechend ihres zytotoxischen Potentials, einen wesentlichen Beitrag an der Entstehung von Epithelschäden zu leisten (Schuiling et al. 1998).

Besonders im entzündlichen Milieu interagiert NO mit Superoxidradikalen (O<sup>2-</sup>) unter Bildung des potenten oxidativen Agens Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>). Dessen Entstehung korreliert ebenfalls mit der NO-Konzentration im Atem und mit dem Ausmaß der bronchialen Hyperreagibilität, ist sensitiv gegenüber Glucocorticoidbehandlung und deutet somit auf dessen wesentliche Rolle in iNOS-induzierter Entzündung der Atemwege (Saleh et al. 1998). Ferner wird durch NO-Synthasen neben NO bei relativem Argininmangel O<sub>2</sub><sup>-</sup> und konsequenterweise ONOO<sup>-</sup> generiert. Dies wurde sowohl an nNOS-transfizierten Zellen als auch an murinen Makrophagen nach iNOS-Stimulation demonstriert (Xia et al. 1996; Xia und Zweier 1997).

Folglich scheint gesteigerte Arginaseaktivität, neben reduzierter zellulärer Argininaufnahme, durch Substratkompetition entscheidend an der iNOS-induzierten ONOO<sup>-</sup>-Produktion und AHR beteiligt zu sein. Zudem üben reaktive Sauerstoffspezies, die in Entzündungssituationen („oxidativer Stress“) vermehrt gebildet werden, zusätzlich einen stimulatorischen Effekt auf die Aktivität der Arginase aus (Matthiesen et al. 2008). Die Relevanz dieser Mechanismen wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Provokation isolierter Tracheen mit Methacholin

nicht nur durch den iNOS-Inhibitor *L*-NAME, sondern auch durch Argininsubstitution und durch den Arginaseinhibitor norNOHA aufgehoben werden konnte (Meurs et al. 2003).



**Abb. 6:** Physiologische und pathophysiologische Funktion des NO bei Asthma bronchiale

Unter physiologischen Bedingungen erfüllt die durch Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktivierte cNOS mit nachfolgender NO-Synthese in picomolaren Mengen wichtige regulatorische Aufgaben in der Physiologie der Atemwege (Bronchodilatation, Bronchoprotektion, antiinflammatorische Effekte). Hingegen induzieren proinflammatorische Zytokine (IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF $\kappa$ B, JAK-STAT) die Expression der iNOS, die daraufhin NO in nanomolaren Konzentrationen synthetisiert, welches sowohl günstige (Infektabwehr) als auch schädliche (Infiltration von Entzündungszellen) Effekte ausübt. Außerdem kommt es zur Generierung reaktiver Stickstoffverbindungen durch Reaktion mit Sauerstoffradikalen. Hinzu kommt, dass die im Entzündungsmilieu durch Th<sub>2</sub>-Zytokine hervorgerufene Überproduktion von Arginase I und II zu einer Substratlimitierung für iNOS führt. Unter diesen Umständen bildet iNOS zusätzlich Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), die mit NO zu dem potenten oxidierenden Agens Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) reagieren. Die Folge sind Zytotoxizität, DNA-Schäden und AHR (modifiziert nach Ricciardolo 2003).

Arginase scheint demnach allein in diesem Zusammenhang in vielerlei Hinsicht zur Pathophysiologie des *Asthma bronchiale* beizutragen. Durch Substratlimitierung kommt es zu einer veringerten NO-Bildung durch eNOS, und somit fehlt ein antiinflammatorischer Faktor, der essentiell zur Bronchodilatation beiträgt. Andererseits stellt die Arginase einen Gegenregulationsmechanismus der iNOS dar, da iNOS hohe NO-Konzentrationen produziert, die neben anderen negativen Effekten auch auf körpereigene Zellen zytotoxisch wirken. Durch Substratdepletion kommt es so zur reduzierten NO-Synthese. Kann aktive iNOS jedoch nicht ausreichend mit L-Arginin abgesättigt werden, wird als Nebenprodukt  $O_2^-$  gebildet. Dies reagiert mit NO spontan zu dem extrem zytotoxischen Agens Peroxynitrit. Die Entzündung wird gesteigert und AHR wird gefördert.

### **2.3 Remodelingprozesse**

*Asthma bronchiale* wird neben den geschilderten Vorgängen durch ausgeprägte Veränderungen struktureller Eigenschaften und der Zusammensetzung zellulärer und extrazellulärer Bestandteile der Bronchialwände gekennzeichnet (Warner und Knight 2008). Die Ursache hierfür ist noch nicht abschließend geklärt. Ein Erklärungsversuch besteht darin, dass es durch fehlgeleitete Reparaturvorgänge nach Epithelschäden zu chronischer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt, welches eine Entzündungsantwort und Remodelingvorgänge in subepithelialen Kompartimenten nach sich zieht (Jeffery 2001; Holgate et al. 2004).

Diese Veränderungen beinhalten sowohl die intensivierte Synthese von extrazellulären Matrixproteinen als auch die Vermehrung von glatten Muskelzellen und subepithelial lokalisierten Fibroblasten. Diese beiden Zelltypen besitzen zudem Eigenschaften, die sie zur Teilnahme sowohl an Remodeling- als auch an Entzündungsprozessen befähigen, wie auch ihrerseits zur Produktion zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren, Proliferation, Migration und Freisetzung von extrazellulären Matrixproteinen, Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren (Johnson und Burgess 2004).



Die extrazelluläre Matrix (ECM) vermittelt nicht nur mechanische Stabilität. Vielmehr handelt es sich um ein komplexes dynamisches Netzwerk von Makromolekülen, insbesondere Kollagen, mit dem Potential, verschiedene Funktionen und Strukturen, einschließlich Differenzierung, Migration und Proliferation zahlreicher Zelltypen, zu unterstützen. Zugleich führt die Interaktion mit Entzündungszellen zur Beeinflussung deren Aktivierungsstatus, Verteilung und Verbreitung, Lebensdauer und Adhäsionsverhalten. Außerdem dient die ECM als Reservoir für Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren (Bousquet et al. 1992; Bousquet et al. 2000). Die Zusammensetzung der ECM wird durch asthmatische Prozesse erheblich beeinflusst, und besonders in der *Lamina reticularis* werden vermehrt Kollagen 1 und 3 und Glycoproteine eingelagert (Roche et al. 1989; Chiappara et al. 2001). Ferner korrelieren die Stärke dieser Schicht und die Kollagenakkumulation direkt mit der Anzahl Myofibroblasten im subepithelialen Gewebe (Brewster et al. 1990; Wilson und Bamford 2001). Grundsätzlich tragen alle lokal angrenzenden Zellen zur Sekretion der ECM bei, den größten Beitrag zur Synthese leisten jedoch Fibroblasten und Myofibroblasten (Kotaru et al. 2006).

Subepitheliale Fibroblasten scheinen neben den glatten Muskelzellen durch Interaktionen sowohl untereinander als auch mit Entzündungszellen oder Epithelien eine Schlüsselfunktion in der Pathophysiologie des *Asthma bronchiale* einzunehmen (Johnson und Burgess 2004). Myofibroblasten stellen einen Phänotyp dar, der sich durch höhere Kontraktilität und Proliferationsraten auszeichnet und über ihre Fähigkeit, vermehrt  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) zu exprimieren, charakterisiert werden kann (Racké et al. 2008). Sie gehen entweder durch gesteigerte Proliferation mit anschließender Differenzierung aus Fibroblasten oder durch epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) aus Epithelzellen hervor, beispielsweise durch nachhaltigen TGF- $\beta$ -Einfluss, oder entstehen durch Ansiedelung von Fibrozyten (Scotton und Chambers 2007; Wynn 2008).

Ob gesteigerte Arginaseaktivität bei *Asthma bronchiale* über die vermehrte Produktion von L-Prolin und den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin durch Bereitstellung des Vorläufermoleküls L-Ornithin (siehe *Abb. 1*) zu den beschriebenen Remodelingvorgängen beizutragen bzw. gesteigerte Proliferation mesenchymaler Zellen und Kollagendeposition zu provozieren vermag, kann noch

nicht abschließend beantwortet werden. Diese Annahme stützt sich auf die bereits in *Kapitel 1.5.2* beschriebenen Beobachtungen, dass Transfektion von glatten Gefäßmuskelzellen mit Arginase I deren Polyaminsynthese und ihr Proliferationsverhalten fördert (Wei et al. 2001). In der Lunge allergenexponierter Mäuse (Zimmermann et al. 2003) und im Serum von Asthmapatienten (Kurosawa et al. 1992) wurden erhöhte Polyaminlevel nachgewiesen. Ferner war die Expression sowohl der Kollagen 1-mRNA als auch von mRNA und Protein der Arginase I und II im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrosen erhöht (Endo et al. 2003). In derselben Studie wurde die Kollokalisierung der Arginase II mit dem kollagenspezifischen Chaperon Hsp47 beschrieben und somit die Rolle der Arginase bezüglich der Kollagensynthese während fibrotischer Vorgänge unterstrichen. Um die Beteiligung der Arginase an Remodelingprozessen des Lungengewebes näher beurteilen zu können, sind jedoch weiterführende Studien erforderlich.

### *TGF- $\beta$*

Reparatur- und fibrotische Prozesse sind in hohem Maße abhängig von Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Epithelzellen. Neben zahlreichen weiteren Wachstumsfaktoren wird hierbei dem *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) durch seine fördernde Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der Fibroblasten zur Produktion von Matrixproteinen in der Pathogenese des *Asthma bronchiale* eine entscheidende Rolle zugesprochen (Duvernelle et al. 2003; Doherty und Broide 2007; Makinde et al. 2007). Tatsächlich konnte in den Atemwegen von Asthmapatienten bei starker eosinophiler Infiltration eine signifikant erhöhte TGF- $\beta$ -Expression detektiert werden, die zudem mit dem Ausmaß der subepithelialen Fibrose und der Anzahl von Fibroblasten korrelierte (Bousquet et al. 2000; Vignola et al. 2001; Doherty und Broide 2007). Neben der Sekretion durch Eosinophile tragen jedoch auch Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Epithelzellen, Makrophagen und Mastzellen zur TGF- $\beta$ -Produktion bei (Duvernelle et al. 2003).

Wie bereits kurz erwähnt wurde, stellt die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) eine wichtige Quelle für Myofibroblasten in der Entwicklung pulmonaler Fibrosen dar. Hierbei erfahren vollständig differenzierte Epithelzellen eine Modifikation hin zu mesenchymalen Zelltypen. In der Folge entstehen vermehrt Fibroblasten und Myofibroblasten. Physiologischerweise spielt die EMT eine wesentliche Rolle bei Reparatur und Narbenbildung nach Epithelverletzungen.

TGF- $\beta$  stellt in diesem Zusammenhang das prototypische Zytokin zur Initialisierung der EMT in der Fibrogenese dar (Willis und Borok 2007).

Bezüglich Remodelingprozessen bei arteriellen Gefäßschädigungen konnten von Durante *et al.* eine Beziehung zwischen TGF- $\beta$  und Argininstoffwechsel demonstriert werden. Einerseits induzierte TGF- $\beta$  die Expression der CAT-1-mRNA und somit die zelluläre Argininaufnahme. Andererseits konnten sowohl Arginase I-Aktivität und mRNA-Expression als auch ODC- und OAT-Aktivität gesteigert werden. Im weiteren Verlauf des Stoffwechselweges wurden erhöhte Polyamin-, Prolin- und Kollagensyntheseraten festgestellt (Durante *et al.* 2001). Um möglicherweise eine Parallelität zu Asthma-assoziierten Remodelingprozessen herstellen zu können, wird in dieser Arbeit der Einfluß des TGF- $\beta$  auf den Argininstoffwechsel und die Regulation der Arginaseisoenzyme an Primärkulturen von Atemwegsfibroblasten und primären Alveolarmakrophagen aus frischen Lungenlavagen der Ratte analysiert.



## B Zielsetzung

Neben dem Potential der Arginase durch Competition mit iNOS um das gemeinsame Substrat *L*-Arginin, Entzündungsprozesse zu beeinflussen, scheint dieses Enzym aktiv an Regenerationsprozessen und der (patho-)physiologischen Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt zu sein. Dies liegt begründet in der Bereitstellung der Aminosäure *L*-Ornithin für die Synthese der Polyamine, welche grundlegende Funktionen bei Prozessen der Zellreplikation ausüben, und von *L*-Prolin, welches in die Synthese von Kollagen mündet, was bei Remodelingprozessen im Verlauf chronisch entzündlicher Reaktionen bedeutsam sein dürfte. Hinzu kommt, dass die Arginase bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen, so auch in der Lunge, in ihrer Aktivität und Expression massiv gesteigert ist.

Vor diesem Hintergrund war die Intention der vorliegenden Arbeit, zu beleuchten, ob die biologische Funktion der extrahepatischen Arginase in den Atemwegen durch Regulation der NO-Synthese, des Zellwachstums und der Kollagensynthese unter proinflammatorischen Bedingungen beschrieben werden kann, und welche physiologischen Mediatoren auf diese Regulation Einfluss nehmen.

Um sich dieser Frage zu nähern, war es zunächst sinnvoll, Mechanismen, die für die Regulation von Expression und Aktivität von Arginase I und Arginase II in primären Atemwegsfibroblasten und Alveolarmakrophagen der Ratte von Bedeutung sind, aufzuklären, sowie die funktionelle Bedeutung von Veränderungen im Arginase-Polyamin- und Arginase-Prolin-Weg für Zellproliferation und -differenzierung bzw. Kollagensynthese zu beleuchten. Hierzu sollte als erstes der Effekt des *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), der häufig mit asthmatischen Prozessen in Zusammenhang gebracht wird, auf Aktivitätszustand und Expressionsprofil von Arginase und iNOS in zwei verschiedenen Zellsystemen der Atemwege ermittelt werden, gefolgt von ansatzweise mechanistischer Aufklärung. Des Weiteren sollte u.a. durch Einsatz verschiedener Arginaseinhibitoren die funktionelle Bedeutung der Arginase auf Proliferation und Kollagensynthese der Atemwegsfibroblasten analysiert werden.

Die pharmakologischen Einflüsse der Testsubstanzen sowie deren Effekt auf das Expressionsmuster der betrachteten Enzyme sollten grundsätzlich sowohl durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden als auch durch funktionelle Untersuchungen der Enzymaktivitäten erfolgen. Hierzu standen die Techniken der Expressionsanalyse durch RT-PCR und Immunoblot auf Ebene von mRNA bzw. Protein, die Möglichkeit nichtradioaktiver Enzymassays zur Ermittlung der Arginase- und iNOS-Aktivität sowie Einbau radioaktiven [<sup>3</sup>H]-Thymidins zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Fibroblasten zur Verfügung.

## C Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien und Enzyme

Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B, wasserlöslich	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin, Sodium Salt	Sigma-Aldrich, München
L-Arginin HCl	Sigma-Aldrich, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA (Albumin, bovin)	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche, Mannheim
Collagenase, High Purity from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
DL- $\alpha$ -Difluoromethylornithin (DFMO)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA Ladder Ready-Load 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
DNA SmartLadder 200 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F12 with Glutamin	PAA, Cölbe
Entwickler-Stammlösung	Sigma-Aldrich, München
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Etylendiamintetraacetat (EDTA), Disodium Salt	Sigma-Aldrich, München

<b>Fetales Kälberserum (FKS)</b>	Biochrom, Berlin
<b>Ficoll 400</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Fixierer-Stammlösung</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Glycin</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Harnstoff</b>	Merck, Darmstadt
<b><math>\alpha</math>-Isonitrosopropiophenon</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Isopropanol</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Kaleidoskop Prestained Standards</b>	BioRad, München
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Leupeptin (Hemisulfate Salt)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> 0127.B8 (LPS)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Lumasafe plus Scintillationsflüssigkeit</b>	Lumac LSC, Groningen
<b>Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl<sub>2</sub> X 6 H<sub>2</sub>O)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Mangan(II)chlorid Monohydrat (MnCl<sub>2</sub> X H<sub>2</sub>O)</b>	Merck, Darmstadt
<b><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Methanol</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Milchpulver, fettfrei</b>	Heirler, Radolfzell
<b>Minimal Essential Medium Eagle (MEM) with Earl's Salt with Glutamin</b>	PAA, Cölbe
<b><i>N</i>-(1-Naphthyl)-ethylendiamin Dihydrochlorid</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Natriumdeoxycholat</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Nonidet P-40</b>	Roche, Mannheim
<b>dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid)</b>	Fermentas, St. Leon-Rot



---

<b>Oligonucleotid (dT)18</b>	MWG, Ebersberg
<b>Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U ml<sup>-1</sup> / 10 mg ml<sup>-1</sup>)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Pepstatin A</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Phosphorsäure 85 % (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Ponceau S</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Protease</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>D<sub>C</sub> (Detergent compatible) Protein Assay Kit</b>	BioRad, München
<b>Omniscript Reverse Transcriptase</b>	Qiagen, Hilden
<b>RNase Inhibitor RNasin Plus (40 U µl<sup>-1</sup>)</b>	Promega, Madison, USA
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen, Hilden
<b>RotiLoad 1</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Salzsäure 32% (konz. HCl)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Schwefelsäure 95% (konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Sodium Pyruvat Solution (SPS) 100 mM</b>	PAA, Cölbe
<b>Sulfanilamid</b>	Merck, Darmstadt
<b>Taq-Polymerase</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>[<sup>3</sup>H]-Thymidin (spez. Aktivität 1 mCi/ml) NET-027A</b>	PerkinElmer, Boston, USA
<b>Trichloressigsäure (TCA)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (Tris HCl)</b>	Boehringer, Ingelheim
<b>Triton X-100</b>	Boehringer, Ingelheim
<b>Trypan Blue Stain (0,4%)</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>10xTrypsin-EDTA Lösung</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich, München

## 1.2 Testsubstanzen

<b>Anacardic Acid (AnA)</b> = 6-Pentadecylsalicylic acid Stocklösung: 1 mM in DMSO Verdünnung: Aqua bidest.	Axxora, Lörrach
<b>S-(2-Boronoethyl)-L-cysteine x NH<sub>4</sub> (BEC)</b> Stocklösung: 10 mM in Aqua bidest. Verdünnung: Aqua bidest.	Axxora, Lörrach
<b>Interleukin-4 (IL-4)</b> rat, recombinant Stocklösung: 0,5 µg/ml in 1xPBS/0,1% BSA Verdünnung: Kulturmedium	Sigma-Aldrich, München
<b>Interleukin-13 (IL-13)</b> human, recombinant Stocklösung: 0,5 µg/ml in 1xPBS/0,1% BSA Verdünnung: Kulturmedium	Sigma-Aldrich, München
<b>Lipopolysaccharide (LPS)</b> Stocklösung: 1 mg/ml in Aqua bidest. Verdünnung: 1xPBS oder Kulturmedium	Sigma-Aldrich, München
<b>N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-arginin x 2HCl (norNOHA)</b> Stocklösung: 10 mM in Aqua bidest. Verdünnung: Aqua bidest.	Axxora, Lörrach

<b>Theophyllin</b> Stocklösung: 30 mM in 0,1 M HCl Verdünnung: Aqua bidest.	Sigma-Aldrich, München
<b>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>1 (TGF-<math>\beta</math>)</b> human, recombinant Stocklösung: 0,2 $\mu$ g/ml in 4 mM HCl/0,1% BSA Verdünnung: Kulturmedium	Sigma-Aldrich, München
<b>Trichostatin A (TSA)</b> Stocklösung: 20 mM in DMSO Verdünnung: Aqua bidest.	Axxora, Lörrach

### **1.3 Antikörper**

Primärantikörper:	Purified Rabbit Anti-Human Collagen Type 1 Biozol, Eching Verdünnung für Immunoblots: 1:750
Sekundärantikörper:	Goat Anti-Rabbit IgG Calbiochem, Darmstadt Verdünnung für Immunoblots: $\approx$ 1:3000

## 1.4 *Primer*

$\beta$ -Aktin	sense: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3' anti-sense: 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'
Arginase I	sense: 5'-AAAGCCCATAGAGATTATCGGAGCG-3' anti-sense: 5'-AGACAAGGTCAACGGCACTGCC-3'
Arginase II	sense: 5'-TTAGTAGAGCTGTGTCAGGTGGC-3' anti-sense: 5'-ACTTGAAGCAATCACATCCACTGC-3'
iNOS	sense: 5'-CATGAACTCCAAGAGTTTGACCAG-3' anti-sense: 5'-GCCCAGGTCGATGCACAACACTGG-3'
TGF- $\beta$ -Rezeptoren	sense: 5'-CAAATGGCGGGGAGAAGAAGG-3' anti-sense: 5'-CATTGCATAGATGTCAGCACG-3'
ODC	sense: 5'-ATGACAGCAGAGCCATAGTGAGC-3' anti-sense: 5'-CGGTCAATGTGGCAACTCATG-3'

Alle Primer wurden synthetisiert von der Firma *MWG*, Ebersberg

## 1.5 *Arbeitsmaterial und Geräte*

Analysenwaage 2444, 2258	Sartorius, Göttingen
Autoklav 80230	Webeco, Bad Schwartau
Brutschränke: Incubator Infrared CO <sub>2</sub>	Forma Scientific, Marietta, USA
Steri-Cycle CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Electron, Dreieich
Elektrophorese- und Blottingkammer NUPAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Fotodokumentationssystem Power Shot G5	Canon, Krefeld
Mikroskop IMT2-RFL	Olympus, Hamburg
Halbmikro-Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Heizblöcke und Thermocycler:	
PCR Thermal Reactor	MWG, Ebersberg
MyCycler	BioRad, München
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
pH-Elektrode SenTix 81	WTW GmbH, Weilheim
pH-Meter inoLab 1	WTW GmbH, Weilheim
Photometer: DU-64	Beckman, München
Gene Quant II	Pharmacia, Freiburg
PVDF Blotting Membran Immobilon P	Millipore, Eschborn
Quarzküvette 10x15 mm Suprasil	Hellma, Müllheim
Sicherheitswerkbänke LaminAir HB HBB 2436	Holten, Allerød, Dänemark
Spannungsgeräte: 2297 Macrodrive 5	LKB Bromme, Schweden
Power Pac 300	BioRad, München
Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR	Packard, Dreieich
Zellkulturflaschen/-platten/-schalen versch. Größe	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugen: 54115 C, 5804 R Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Labofuge GL, Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Mini-Zentrifuge MCF 2360	LMS, Tokio, Japan

## **1.6 Software**

GraphPad Prism 4.00	graphische Darstellungen
GraphPad InStat 3.01	statistische Berechnungen
MS Office 2003	Berechnungen / Abbildungen / Textbearbeitung
PhotoImpact	Fotobearbeitung
RFLPscan 2.01	quantitative Erfassung optischer Dichten

## 2 Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Primäre Alveolarmakrophagen der Ratte

Zur Gewinnung der primären Alveolarmakrophagen wurden 2-4 Monate alte Sprague-Dawley-Ratten aus hauseigener Zucht verwendet. Sie wurden per Genickschlag betäubt, das Rückenmark durchtrennt und ausgeblutet. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, Thymus und Herz entfernt und die Lunge samt Trachea herausgelöst. Mit Hilfe einer 50 ml Spritze, die über eine Pipettenspitze mit der Trachea verbunden wurde, wurden 5-10 ml 4°C kaltes 1xPBS vorsichtig in die Lunge gefüllt. Während die Lunge nun leicht massiert wurde, wurde mit Hilfe einer 10 ml Spritze die Lavage aus der Lunge wieder entfernt. Dieser Prozedur wurde jede Lunge dreimal unterzogen. Die gewonnene Zellsuspension wurde in sterilen Röhrchen gesammelt und 10 min bei 400 g zentrifugiert. Die resultierenden Zellsedimente wurden in 10 ml sterilem 1xPBS gewaschen, vereinigt und erneut 10 min bei 400 g zentrifugiert. Das nun gewonnene Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde nach Trypanblaufärbung die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Mit dieser Methode konnten pro Ratte durchschnittlich 6-10 Mio Alveolarmakrophagen gewonnen werden.

Die erforderliche Anzahl Zellen wurde auf die jeweiligen Kulturschalen ausgesät und mit der entsprechenden Menge Medium versetzt. Hierauf folgte eine zweistündige Adhäsionsphase bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, nach der das Kulturmedium erneuert und die entsprechenden Testsubstanzen aufgebracht wurden.

10xPBS pH 7,4-7,5 (-Mg<sup>2+</sup>, -Ca<sup>2+</sup>):

- 27 mM KCl
- 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,38 M NaCl
- 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Makrophagenmedium:	DMEM / Ham'F12 [1:1] mit Glutamin 5% (v/v) FKS 100 U/ml // 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 5 µg/ml Amphotericin B
0,15 % Trypanblau-Lösung:	0,4% Trypan Blue Stain 3:8 verdünnt in sterilem 1xPBS

### **2.1.2 Primäre Atemwegsfibroblasten der Ratte**

Von den wie unter 2.1.1 beschrieben lavierten Lungen wurde zur Gewinnung primärer trachealer Fibroblasten die Trachea entfernt und in 1xPBS überführt. Unter sterilen Bedingungen wurden sie zweimal in 1xPBS gewaschen, von verbliebenen Geweberesten gesäubert, der Länge nach aufgeschnitten und zur Dissoziation des Gewebes 20-30 min bei 37°C einem Proteaseverdau unterzogen. Es folgte die mechanische Entfernung des inneren und äußeren Epithels mit Hilfe eines Wattestäbchens. Das so gereinigte Gewebe wurde anschließend mit einem Skalpell zerteilt, ausplattiert, mit Edelstahlnetzen beschwert und mit 15% FKS-haltigem Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Medienwechsel erfolgte regelmäßig alle zwei Tage. Nach 10-14 Tagen bildeten sich dichte, adhärenz Zellenester. Vor der ersten Passage in Zellkulturflaschen wurden Netze und Gewebestücke entfernt und der Zellrasen zweimal vorsichtig mit 1xPBS gewaschen, um noch vorhandene Serumreste zu entfernen. Zum Detachment der Zellen von der Polymeroberfläche wurde 5%ige auf 37°C vorgewärmte Trypsinlösung verwendet. Um die optimale Einwirkzeit herauszufinden, wurde die Trypsinierung mikroskopisch kontrolliert. Nachdem sich die überwiegende Anzahl adhärenz Zellen abgerundet hatte und nach leichtem Schlagen der Platte im Überstand schwamm, wurde die Reaktion mit frischem 10% FKS-haltigem Kulturmedium durch die neutralisierende Wirkung des Serums abgestoppt.

Zur Versuchsaussaat wurden die Zellen nach gerade beschriebener Methode bis zu fünfmal passagiert.



---

Fibroblastenmedium:	DMEM / Ham'F12 [1:1] mit Glutamin 10-15% (v/v) FKS 100 U/ml // 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 5 µg/ml Amphotericin B
Protease-Lösung:	1 mg/ml Protease in Fibroblastenmedium
1xTrypsin-EDTA-Lösung:	10xTrypsin-EDTA-Lösung 1:10 verdünnt in sterilem 1xPBS

## 2.2 *Enzym-Assays*

### 2.2.1 *Arginase-Assay*

(nach Corraliza et al. 1994)

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde, katalysiert das Enzym Arginase die Umsatzreaktion seines Substrates *L*-Arginin zu *L*-Ornithin und dem Nebenprodukt Harnstoff. Als Kofaktor benötigt die Arginase  $Mn^{2+}$ -Ionen, durch die bei einem pH-Optimum von 9,7 das katalytische Zentrum des Enzyms aktiviert wird. Harnstoff ist eine analytisch leicht zugängliche Substanz, deren Entstehung durch Farbreaktion mit  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (ISPF) nachverfolgt und photometrisch detektiert werden kann. Die entstandene Harnstoffmenge während einer definierten Umsatzreaktion dient anschließend zur Quantifizierung der Arginaseaktivität.

Zur Quantifizierung der Arginaseaktivität zum Zeitpunkt der Zelllyse über die Erfassung der Harnstoffkonzentration wurden Alveolarmakrophagen wie unter 2.1.1 beschrieben präpariert. Je 1 Mio Zellen wurden auf 12-Well-Zellkulturschalen ausgesät und mit 500 µl Medium versetzt. Nach zweistündiger Adhäsionsphase und anschließendem Medienwechsel wurden die Zellen 20 h in Anwesenheit der Testsubstanzen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Im Falle der Atemwegsfibroblasten wurden 0,2 Mio Zellen mit 1 ml Zellkulturmedium wie unter 2.1.2 beschrieben auf 6-Well-Zellkulturschalen aufgebracht und 48 h kultiviert. Nach erfolgtem Wechsel des Zellkulturmediums wurden die Testsubstanzen zugesetzt und weitere 40 h inkubiert.

Der aus diesen Behandlungen hervorgehende Kulturüberstand diente der anschließenden Nitritbestimmung. Die adhärennten Zellen wurden 30 min mit 750  $\mu\text{l}$  0,1% TritonX100 mit Proteaseinhibitoren lysiert. 500  $\mu\text{l}$  des Zelllysates wurden im Verhältnis 1+1 mit Tris-gepufferter Manganchloridlösung pH 7,4 versetzt. Um die Bindung der  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen an das Enzym zu beschleunigen, wurden die Ansätze 10 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt. 50  $\mu\text{l}$  des Zelllysates wurden für die Protein-Bestimmung nach Lowry (siehe 2.4.2) eingesetzt. 50  $\mu\text{l}$  des aktivierten Lysates wurden wiederum im Verhältnis 1+1 mit Tris-gepufferter *L*-Argininlösung pH 9,7 versetzt, dem Substrat für die nun folgende einstündige Umsatzreaktion bei 37°C im Wasserbad zu *L*-Ornithin und Harnstoff. Zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Versuchsansatz wurde nun eine 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Harnstoff-Standardlösung, eine 25 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,7 sowie die Triton-Tris- $\text{Mn}^{2+}$ -Lösung hergestellt, aus denen die Standards zur Erstellung einer Regressionsgeraden aus den absoluten Harnstoffmengen 1, 2, 5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{g}$  in 100  $\mu\text{l}$  Endvolumen erhalten wurden. Der Leerwert bestand aus 50  $\mu\text{l}$  25 mM Tris-HCl pH 9,7 sowie 50  $\mu\text{l}$  Triton-Tris-Mn-Lösung. Da es sich um eine empfindliche Nachweisreaktion für Harnstoff handelt, wurde grundsätzlich eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das Abstoppen der Substratumsatzphase erfolgte durch Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  Säuremix sowohl zu jeder Probe wie auch zu den Standards. Der anschließende Detektionsschritt beinhaltete die Reaktion des entstandenen Harnstoffs mit  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (50  $\mu\text{l}$ ). Nach gründlicher Durchmischung folgte eine Inkubationsphase von 45 min bei 100°C im Wasserbad mit anschließender spektralphotometrischer Vermessung des entstandenen Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 540 nm. Je nach Harnstoffkonzentration lief in den Reaktionsansätzen eine rot-violette Farbreaktion unterschiedlicher Intensität ab, wobei das daraus hervorgehende Reaktionsprodukt nicht genau bekannt ist.

Eine internationale Einheit Arginaseaktivität ist definiert durch die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Harnstoff pro Minute. Die Ergebnisse der Messung wurden in mU/mg Protein angegeben.

---

Lysepuffer für Arginaseassay:	0,1% TritonX100 1 mM PMSF 2 mM EDTA pH 8 1 $\mu$ M Pepstatin A 1 $\mu$ M Leupeptin
Manganchlorid-Lösung pH 7,4:	5 mM MnCl <sub>2</sub> 25 mM Tris-HCl 20% NaOH zur pH-Einstellung auf pH 7,4
L-Arginin-Lösung pH 9,7:	0,5 M L-Arginin 250 mM Tris-HCl pH 9,7 20% NaOH zur pH-Einstellung auf pH 9,7
Triton-Tris-Mn <sup>2+</sup> -Lösung:	1 T 1 % TritonX100 + PI 1 T Manganchlorid-Lösung pH 7,4
Säuremix:	1 T H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz. 3 T H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% 7 T Aqua bidest.
$\alpha$ -Isonitrosopropiophenon:	9% ISPF in Ethanol (w/w)

## 2.2.2 Spektralphotometrische Bestimmung von Nitrit

(nach Schmidt et al. 1988)

Das durch die NO-Synthasen synthetisierte NO-Radikal reagiert mit Sauerstoff über verschiedene Zwischenprodukte zu Nitrit- und Nitrationen. Das relativ stabile Nitrition kann mit Hilfe der Griess-Reaktion spektralphotometrisch nachgewiesen werden.

Nach der 20- bzw. 40stündigen Inkubationsphase der Versuchsansätze aus 2.2.1 wurde die iNOS-Aktivität anhand der im Kulturüberstand kumulierten Nitritkonzentration bestimmt. Grundlage für dieses spektralphotometrische Verfahren stellt die Griess-Reaktion dar. Hierzu wurden 400  $\mu$ l Kulturüberstand in Halbmikroküvetten mit 400  $\mu$ l Griessreagenz versetzt und nach 20minütiger Inkubationszeit bei einer

Wellenlänge von 540 nm spektralphotometrisch vermessen. Die Nitritkonzentration wurde anhand einer Regressionsgeraden bestimmt, die aus NaNO<sub>2</sub>-Standards der Konzentrationen 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 und 80 µM in Kulturmedium erstellt wurde. Die Standards wurden parallel zu den Proben mit Griessreagenz behandelt und vermessen.

Giess-Reagenz:    10 mg/ml Sulfanilamid  
                      1 mg/ml N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-HCl  
                      2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

## **2.3 mRNA Expressionsanalyse**

### **2.3.1 RNA-Präparation**

5-6 Mio wie unter 2.1.1 beschrieben präparierte Alveolarmakrophagen, bzw. 0,2-0,5 Mio Atemwegsfibroblasten aus 2.1.2, wurden auf 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit 2 ml Kulturmedium versetzt. Nach zweistündiger Ruhephase, in der die meisten Zellen adhärirten, wurde das Kulturmedium erneuert, und die Testsubstanzen wurden zugesetzt. Nach der meist 20stündigen Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand verworfen und der Zellrasen für die anschließende RNA-Isolation lysiert. Diese erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Tissue Kits* der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben. Zum Schutz der RNA vor Hydrolyse durch RNasen wurden wässrige Lösungen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-vorbehandeltem, autoklaviertem Wasser hergestellt und sämtliche Glaswaren vor ihrer Verwendung sterilisiert. Des Weiteren wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

DEPC-Wasser:    0,1% DEPC in Aqua bidest.  
                      über Nacht inkubiert, anschließend autoklaviert

### **2.3.2 Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die erfolgreiche Isolation und die erhaltene Konzentration wurden nach 1:40-Verdünnung mit sterilem Wasser im *GeneQuant* der Firma PHARMACIA durch photometrische Absorptionsmessung bei 260 nm überprüft. Dies ist möglich, da die

Purin- und Pyrimidinbestandteile der Nukleinsäuren mesomere Strukturen aufweisen, folglich durch UV-Licht angeregt werden, und somit eine Absorption gemessen werden kann. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm stellt ein Maß für die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung durch Proteine dar. Er sollte im Falle der RNA bei ~2,0 liegen.

### **2.3.3 Reverse Transkription**

Zum Nachweis der exprimierten Transkripte durch anschließende PCR-Amplifikation musste die isolierte mRNA zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierbei wurde das Enzym *Omniscript Reverse Transcriptase* der Firma QIAGEN verwendet, ein recombinantes heterodimeres Enzym, das in *E.coli* exprimiert wird.

Für die Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA aus der unter 2.3.1 beschriebenen Präparation eingesetzt, mit 0,5 mM dNTP-Mix, 1 µM Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern, 0,25 U RNase Inhibitor und 4 U Reverser Transkriptase versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde 60 min bei 37°C und 10 min bei 93°C im Heizblock inkubiert, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gelagert. Mit sterilem Wasser wurde das Volumen auf 100 µl ergänzt und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Durch Verwendung RNase-freier Arbeitsmaterialien und arbeiten auf Eis wurde die RNA vor einem Abbau durch RNasen geschützt.

### **2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

(nach Mullis et al. 1986)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Der Prozess besteht aus einer Serie von 25-35 Zyklen, wobei jeder Zyklus drei Schritte umfasst. Zu Beginn wird die doppelsträngige Template-DNA in Einzelstränge denaturiert. In der anschließenden Annealingphase hybridisieren die spezifisch ausgewählten Primer (17-28 bp lange Oligonukleotide) durch Temperaturabsenkung auf die jeweils berechnete Annealingtemperatur an ihre komplementäre Region auf der DNA. Sie bilden nun den Startpunkt für die folgende DNA-Neusynthese durch die Taq-

Polymerase. Hierbei handelt es sich um eine Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, die sich durch hohe Thermostabilität auszeichnet und somit die hohen Denaturierungstemperaturen übersteht.

Jede PCR wurde standardmäßig in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Template wurden jeweils 5 µl des betreffenden cDNA-Pools mit 0,5 µM 5'- („sense“-) Primer und 3'- („antisense“-) Primer, je 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U *Taq-Polymerase* der Firma INVITROGEN und den Herstellerangaben entsprechenden Pufferbedingungen versetzt. Die Primerpaare wurden intronübergreifend angeordnet, um eine Amplifikation genomischer DNA-Verunreinigungen auszuschließen.

In einem PCR-Zyklus wurden nun die folgenden Reaktionsschritte durchlaufen, die je nach Annealingtemperatur der verwendeten Primer und Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst wurden:

Denaturierung	94°C	45 sek
Annealing	52-60°C	30 sek
Elongation	72°C	30 sek - 1 min

Dem ersten Zyklus wurde eine dreiminütige initiale Denaturierungsphase vorgeschaltet. Nach dem letzten Zyklus wurde eine 10minütige finale Elongation durchgeführt, um die Synthese unvollendeter PCR-Produkte zu beenden. Die Anzahl der Zyklen lag zwischen 23 und 35.

### **2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Die während der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bei der Elektrophorese werden Nukleinsäuren gemäß ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld aufgetrennt, das an eine Gelmatrix angelegt wird. Dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der Nettoladung, Größe und Konformation der Moleküle, sowie der Ionenstärke, der Porengröße und der Temperatur der verwendeten Gelmatrix.

Die hier verwendeten 1,2%igen Agarosegele wurden mit 0,33 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid versetzt und in horizontale Gelträger gegossen. Die

erstarrten Gele wurden in der Elektrophoresekammer mit 0,5xTBE-Puffer bedeckt und 20-50 µl der PCR-Probe, deren Dichte zuvor mit 10% Probenpuffer erhöht wurde, aufgetragen. Im elektrischen Feld konstanter Stärke (~15 V/cm) wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode und legen dabei entsprechend ihrer Länge unterschiedliche Strecken im Gel zurück. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die Helixstruktur konnten die DNA-Stränge im UV-Licht visualisiert und mit dem Fotodokumentationssystem *Power Shot G5* der Firma CANON dokumentiert werden. Anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards wurde die Länge der Fragmente qualitativ beurteilt. Die photographische Dokumentation erlaubte eine densitometrische Vermessung der Bandenintensität mittels RFLPscan-Software. Die quantitative Beurteilung im Expressionsniveau erfolgte abschließend nach Bildung des Quotienten zur Bandenstärke der Amplifikate des konstitutiv exprimierten Strukturgens für  $\beta$ -Aktin.

5xTBE-Puffer:	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 0,012 M EDTA
Agarosegel:	1,2% (w/v) Agarose in 0,5xTBE 0,3 µg/ml Ethidiumbromid
Probenpuffer:	15% (w/v) Ficoll 400® 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,5xTBE

## 2.4 Westernblot-Analyse

### 2.4.1 Protein-Präparation

0,3 Mio wie unter 2.1.2 beschrieben präparierte Atemwegsfibroblasten der Ratte wurden auf 55 mm Schalen ausgesät und mit 2 ml prolinfreiem Fibroblastenmedium mit 10% FKS versetzt. Am nächsten Tag wurde nach sorgfältigem Waschen mit 1xPBS das Medium erneuert und die Testsubstanzen zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug meist zwei oder vier Tage. Zwei Tage vor der Protein-Präparation wurde den Zellen das Serum entzogen. Vorher wurde der Zellrasen sorgfältig mit warmer 1xPBS-Lösung gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Bei viertägiger Inkubation wurden gleichzeitig die Testsubstanzen frisch zugesetzt. Am Ende der Inkubationsperiode wurden die Zellüberstände in sterile Reaktionsgefäße überführt und sofort bei -20°C gelagert, um sie vor Proteasenaktivität zu schützen. Die adhärennten Zellen wurde zweimal mit kaltem 1xPBS gespült und anschließend mit einer geeigneten Menge (200-500 µl) RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren lysiert, abgeschabt, bei 3000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um grobe Zellreste abzutrennen, und die Überstände anschließend bei -20°C gelagert. Alle Arbeitsgänge wurden zum Schutz vor Proteasenaktivität stets auf Eis durchgeführt.

Prolinfreies Fibroblastenmedium:      Earl's MEM with Glutamin  
0-10% (v/v) FKS  
1 mM Natrium Pyruvat Solution  
100 U/ml // 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

RIPA + PI:                      50 mM Tris-HCL  
150 mM NaCl  
0,5% Natriumdeoxycholat  
1% Nonidet P-40  
0,1% SDS  
1 mM PMSF  
2 mM EDTA pH 8  
1 µM Pepstatin A  
1 µM Leupeptin



### **2.4.2 Proteinkonzentrationsmessung nach Lowry**

(nach Lowry et al. 1951)

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung nach Lowry beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der die Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung zunächst einen Komplex bilden. Es folgt die Reduktion des Folin-Reagenzes, wobei blaue Reaktionsprodukte entstehen, an deren Bildung hauptsächlich die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch Cystin, Cystein und Histidin beteiligt sind. Die Farbentwicklung kann spektralphotometrisch erfasst werden und dient als Maß der Proteinkonzentration.

In den Experimenten kam das *D<sub>C</sub> Protein Assay Kit* der Firma BIORAD nach den Vorgaben des Herstellers zum Einsatz. 5  $\mu\text{l}$  des Zelllysats aus der Protein-Präparation der primären Atemwegsfibroblasten (siehe 2.4.1), aufgefüllt auf 50  $\mu\text{l}$  mit 0,1% TritonX100-Lösung, bzw. 50  $\mu\text{l}$  des Zelllysats der Ratten-Alveolarmakrophagen aus dem Arginase-Assay (siehe 2.2.1) wurden mit 100  $\mu\text{l}$  frisch hergestelltem Reagenz A' (1% Reagenz S in Reagenz A) und anschließend mit 800  $\mu\text{l}$  Reagenz B versetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei einer Wellenlänge von 750 nm spektralphotometrisch vermessen. Entsprechend wurde mit je 50  $\mu\text{l}$  Standards aus Rinderserumalbumin (BSA) der Konzentrationen 50, 100, 300, 700, 1100 und 1500  $\mu\text{g/ml}$  in 0,1% TritonX100 verfahren. Somit konnte über eine Regressionsgerade die Konzentration der Proteinproben interpoliert werden.

### **2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur analytischen Trennung von Proteinen. SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion der Disulfidbrücken mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, vollständig denaturiert und Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbindet. Die Proteine liegen anschließend in linearisierter Form vor. Es kommt zur Bildung von SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs:Masse-Verhältnis, wobei die starke negative Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. Somit wandern sie im elektrischen Feld Richtung Anode, wobei sie durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrer Molekularmasse getrennt werden.

Zur Denaturierung wurden die Proteinproben mit 1/4 bis 1/3 Volumenanteil reduzierendem Probenpuffer *RotiLoad* der Firma ROTH versetzt und 10 min bei 70°C im Heizblock inkubiert.

Für die Durchführung der Elektrophorese kam das System *NuPAGE* der Firma INVITROGEN zur Anwendung. Die verwendeten Polyacrylamidgele waren in der Regel 8-12%ige Gradientengele, deren Geltaschen ein maximales Probenvolumen von 20 µl aufnehmen. Als Elektrophoresepuffer wurde *20xNuPAGE MOPS SDS Running Buffer* der Firma INVITROGEN verwendet, der unmittelbar vor der Anwendung mit Aqua dest. verdünnt wurde. Die Elektrophorese lief bei konstanten 200 V und 100-120 mA über 70-80 min ab. Als Größenstandard wurden 5 µl eines Kaleidoskopmarkers aufgetragen.

#### **2.4.4 Immunoblot**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden wurden anschließend ebenfalls in der *NuPAGE*-Apparatur elektrophoretisch auf eine hydrophobe PVDF-Membran transferiert. Diese Membranen zeichnen sich aus durch eine hohe Proteinbindungskapazität. Vor ihrem Einsatz musste die Membran in Methanol quellen, da sie ansonsten mit wässrigen Lösungen nicht benetzbar war. Um die Transferrate zu erhöhen, wurde dem Transferpuffer 20% Methanol zugesetzt. Dies lockert die Bindung des SDS an die Proteine und erleichtert somit deren Bindung an die Membran. Alle Bestandteile des Sandwichs, also die Membran, das Gel, Schwämme und Filterpapier, wurden vor ihrem Einsatz in Transferpuffer equilibriert. Beim Aufbau und Einsetzen in die Blotapparatur war darauf zu achten, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode ausgerichtet wurden. Nachdem die Apparatur mit Transferpuffer befüllt wurde, lief der Blotvorgang ca. 1,5 h bei 30 V und ca. 170 mA ab. Zur Kontrolle wurde das Proteinbandenmuster nach dem Transfer durch eine Ponceau-Färbung sichtbar gemacht und anschließend mit TBS entfärbt. Da die Ponceau-Lösung Trichloressigsäure enthält, wurden gleichzeitig die Proteine auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen über Nacht bei 4°C mit 5%iger Blockinglösung inkubiert, um die Sensitivität des Systems zu erhöhen und Hintergrundsignale gering zu halten. Der nächste Schritt bestand nun in der Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das Epitop seines Zielproteins. Hierzu wurde die Membran mit einer

58

Antikörperverdünnung in 3%iger Blockinglösung 90 min inkubiert. Nach je zwei 10minütigen Waschschritten mit 0,1% TBST und 3%iger Blockinglösung folgte in einem zweiten Schritt die Bindung des sekundären, mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörpers an die konstante Region des Primärantikörpers. Hierzu wurde eine Verdünnung des entsprechenden Sekundärantikörpers in 3%iger Blockinglösung hergestellt und 45 min inkubiert. Anschließend wurde viermal 15 min mit 0,1% TBST gewaschen. In dieser Zeit wurde das Detektionsreagenz (*BM Chemiluminescence Kit* der Firma ROCHE) angesetzt. Bei dieser Nachweisreaktion katalysiert das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Peroxidase die Substratumsetzung in ein lumineszierendes Produkt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die TBST-Lösung entfernt und die mit Proteinen besetzte Membranseite 60 s mit Detektionslösung benetzt. Anschließend wurde die Membran in einen Gefrierbeutel eingeschlagen und in einer Filmkassette fixiert. Ein Röntgenfilm wurde für 30 bis 90 s exponiert, entwickelt, fixiert und ausgiebig gewässert. Mit einem zweiten Film wurde die Belichtungsdauer optimiert. Nach dem Trocknen konnten die Filme gescannt und mit Hilfe der RFLPscan-Software die optische Dichte der Proteinbanden gemessen und auf diese Weise quantitativ ausgewertet werden.

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Ponceau S-Lösung:	0,2% (w/v) Ponceau S 3% (w/v) Trichloressigsäure
TBS pH 7,5:	50 mM Tris 150 mM NaCl HCl zur pH-Einstellung auf pH 7,5
TBST:	0,05% bzw. 0,1% (v/v) Tween 20 in TBS
Blockinglösung:	3% bzw. 5% (w/v) fettfreies Milchpulver in 0,05% TBST

### **2.4.5 Strippen bereits detektierter Membranen**

Nach dem Immunoblot und der Detektion konnten die Protein-Antikörperbindungen durch Einwirkung von Lauge wieder gelöst werden. Dazu musste eine bereits getrocknete Membran zuvor mit Methanol befeuchtet und zum Entfernen der Detektionslösung 5 min in Aqua bidest. gewaschen werden. Im Anschluss folgte eine fünfminütige Behandlung mit 0,2%iger NaOH-Lösung und erneutes Wässern. Durch Inkubation mit 5%iger Blockinglösung, wie unter 2.4.4 beschrieben, wurde die Membran auf die Reaktion mit einem weiteren Primärantikörper vorbereitet.

### **2.4.6 Kollagenaseverdau**

Zur Spezifitätsbestimmung des Antikörpers gegen Kollagen 1, wurde während der Etablierungsphase ein Kollagenaseverdau durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Proteinpräparationen derart mit der Kollagenaselösung versetzt, dass eine enzymatische Aktivität von 60 U/ml im Versuchansatz resultierte. Um eine optimale Kollagenaseaktivität zu gewährleisten, wurde die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration auf 5 mM eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze 4 h bei 37°C unter ständiger Bewegung inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bei hoher Spezifität des Antikörpers sollten in den Proben, die diesem Kollagenaseverdau unterzogen wurden, im darauf folgenden Immunoblot keine Kollagen 1-Signale detektierbar sein.

TES pH 7,4:                    50 mM Tris  
                                      20 mM NaCl  
                                      5 mM EDTA  
                                      5 mM  $\text{CaCl}_2$   
                                      HCl zur pH-Einstellung auf pH 7,4

190 U/ml Kollagenaselösung:    0,1 mg/ml Collagenase in TES

## 2.5 Proliferations-Assay

(nach Naito et al. 1987)

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu ermitteln, ist es möglich, markierte DNA-Bausteine für die Replikation zur Verfügung zu stellen. Eine klassische Methode, neu synthetisierte DNA in der gesamten Zellpopulation zu quantifizieren, funktioniert über den Einbau radioaktiv markierten Thymidins ( $[^3\text{H}]$ -Thymidin).

0,2 Mio wie unter 2.1.2 beschrieben präparierte Atemwegsfibroblasten der Ratte wurden auf 12-Well-Platten aufgebracht und mit 1 ml prolinfreiem Fibroblastenmedium mit 10% FKS versetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert und die Testsubstanzen zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug meist zwei oder vier Tage. Zwei Tage vor der Zellyse wurde den Zellen das Serum entzogen. Vorher wurde der Zellrasen sorgfältig mit warmer 1xPBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Bei viertägiger Inkubation wurden gleichzeitig die Testsubstanzen frisch zugesetzt. 24 h vor der Zellyse wurde in jedes Well 1  $\mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]$ -Thymidin zugesetzt. Zu Beginn des Assays wurden alle Überstände abgenommen und verworfen, jedes Well zweimal mit 1 ml kalter 1xPBS Lösung gespült, mit 1 ml Trichloressigsäure 5% (w/v) versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen mit 1 ml 0,1 M NaOH ca. 1 h bei 37°C lysiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  1 M Tris-HCl pH 7,4 zugesetzt, 300  $\mu\text{l}$  der Proben mit 3 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationscounter der Firma PACKARD vermessen. Als Leerwert dienten 300  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus 1 ml 0,1 M NaOH mit 200  $\mu\text{l}$  1 M Tris-HCl pH 7,4 in 3 ml Scintillationsflüssigkeit.

Prolinfreies Fibroblastenmedium:	Earl's MEM with Glutamin
	0-10% (v/v) FKS
	1 mM SPS
	100 U/ml // 100 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin/Streptomycin

## **2.6 Statistik**

Als statistische Größe wurden die arithmetischen Mittelwerte und die statistische Schwankung der Mittelwerte (SEM) verwendet. Für die Berechnung statistischer Unterschiede zweier Testreihen wurde der zweiseitige t-Test nach Student durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  wurde bei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

## D Ergebnisse

### 1 Einfluss von TGF- $\beta$ auf Aktivität und Expression der Arginase-Isoenzyme sowie der induzierbaren NO-Synthase in zwei verschiedenen Zellsystemen der Atemwege

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, spielt TGF- $\beta$  in der Pathogenese des *Asthma bronchiale* und hier insbesondere bei Remodeling-Prozessen eine entscheidende Rolle (Duvernelle et al. 2003). Ebenso zeigen Befunde aus Wundfibroblasten, eine deutliche Hochregulation der Arginase I durch TGF- $\beta$  (Witte et al. 2002). Über mögliche Effekte des TGF- $\beta$  auf Arginase in Atemwegszellen ist noch nicht viel bekannt und soll deshalb hier sowohl an primären Alveolarmakrophagen (RAM) wie auch an primären Atemwegsfibroblasten (rFB) der Ratte näher untersucht werden.

#### 1.1 Expression und Aktivität der Arginasen und iNOS in Alveolarmakrophagen und Atemwegsfibroblasten

Zunächst wurden die basalen Expressions- und Aktivitätsverhältnisse der beteiligten Enzymsysteme charakterisiert:

*Tabelle 3* zeigt das Grundniveau der Arginaseaktivität sowie der Nitritakkumulation von Alveolarmakrophagen und Atemwegsfibroblasten im Vergleich nach einer Kultivierungsphase unter Kontrollbedingungen von 20 h im Falle der Makrophagen bzw. 40 h im Falle der Fibroblasten mit jeweils  $n = 3$  in den einzelnen Versuchsansätzen. Beide Enzymsysteme weisen im Vergleich der zwei Zelltypen in den Alveolarmakrophagen eine etwa 10fach höhere Aktivität im Grundniveau auf.

	<b>Arginaseaktivität</b> <b>[mU/mg Protein]</b>	<b>Nitritakkumulation</b> <b>[<math>\mu</math>M]</b>
<b>Alveolarmakrophagen</b>	273 $\pm$ 16 <i>n</i> =37	120 $\pm$ 17 <i>n</i> =33
<b>Atemwegsfibroblasten</b>	26 $\pm$ 3 <i>n</i> =18	15 $\pm$ 4 <i>n</i> =16

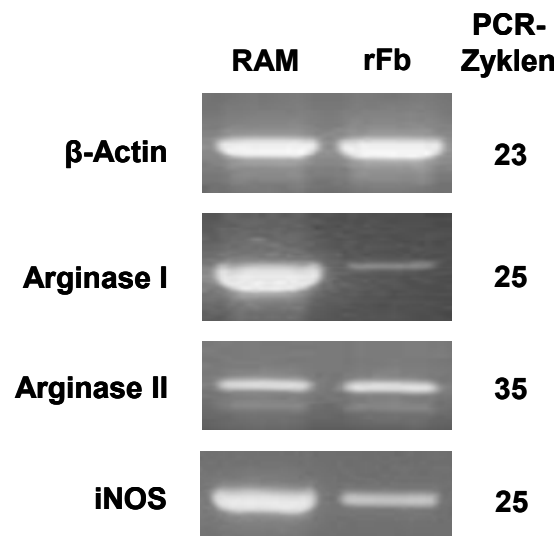
**Tab. 3:** Vergleich der basalen Arginaseaktivität und Nitritakkumulation in Alveolarmakrophagen und Atemwegsfibroblasten der Ratte. Die Makrophagen wurden 20 h, die Fibroblasten 40 h unter Kontrollbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Arginaseaktivität im Zellysat und die Nitritkonzentration im Kulturüberstand bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In *Abbildung 7* ist das Ergebnis der vergleichenden mRNA-Expressionsanalyse der betrachteten Enzymsysteme unter den oben genannten Kontrollbedingungen dargestellt.

Die Signale für Arginase I und iNOS waren bereits nach 25 Amplifikationszyklen detektierbar, wohingegen die Durchführung von 35 Zyklen notwendig war, um ein Signal für Arginase II zu erhalten. Um das Kontrolltranskript  $\beta$ -Aktin zu detektieren, reichten bereits 23 Zyklen aus.

Arginase I und iNOS werden im Grundzustand deutlich stärker von den Alveolarmakrophagen als von den Atemwegsfibroblasten exprimiert. Arginase II-Expression befindet sich in beiden Zellsystemen auf ähnlichem Level und zusätzlich auf deutlich schwächerem Expressionsniveau als die Arginase I.





**Abb. 7:** Vergleich der basalen Expression von Arginase I, Arginase II und iNOS in Alveolarmakrophagen (RAM) und Atemwegsfibroblasten (rFb) der Ratte. Die Makrophagen wurden 20 h, die Fibroblasten 40 h unter Kontrollbedingungen kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt.

In die Auswertung dieser und der folgenden Datensätze flossen ausschließlich Versuchsdaten von Zellpräparationen ein, deren Nitritakkumulation unter Kontrollbedingungen eine Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  im Kulturüberstand nicht überschritt, und somit von einer geringen Vorstimulation ausgegangen werden konnte. Sämtliche Präparationen, die darüber lagen, wurden verworfen. Diese Vorstimulation, insbesondere der Alveolarmakrophagen, ist einerseits auf die Verwendung von Primärkulturen zurückzuführen. Deren Gewinnung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, aus verschiedenen Tieren. Außerdem spielten die Jahreszeiten, eine mögliche Keimexposition und das Alter der Tiere eine Rolle. Andererseits können stimulierende Prozesse während der Kultivierungsphase, wie z.B. Reaktion auf Serumbestandteile oder Vereinigung der Zellen verschiedener Tiere, nie vollständig ausgeschlossen werden.

Da die Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuchsansätze deutlich geringer waren als die Schwankungen zwischen verschiedenen Zellpräparationen, werden im Folgenden die Absolutwerte nicht mehr genannt, sondern der Effekt der Testsubstanzen als Prozent der Kontrolle der jeweiligen Zellpräparation ausgedrückt.

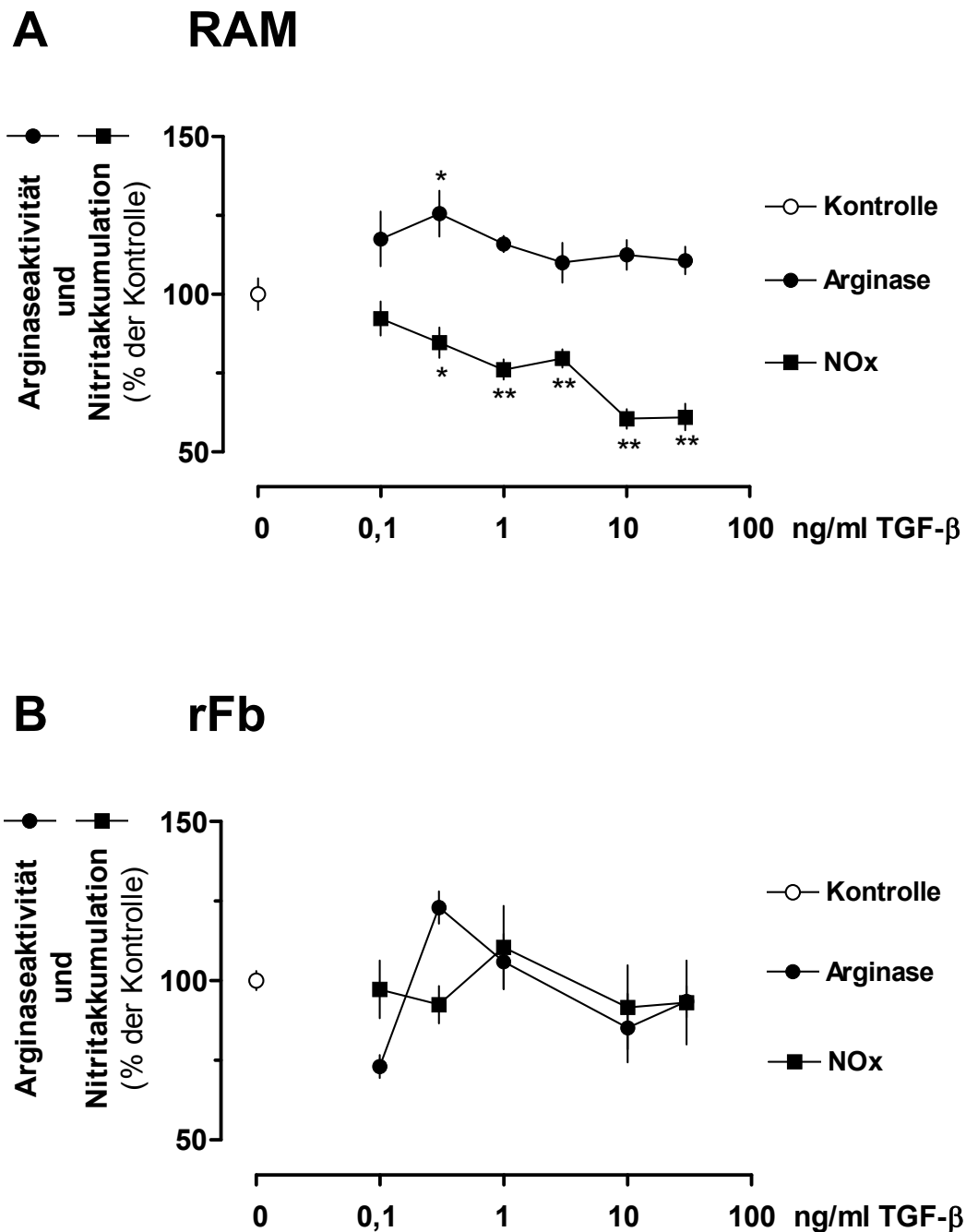
## **1.2 Einfluss des TGF- $\beta$ auf Arginase- und iNOS-Aktivität**

### **1.2.1 Alveolarmakrophagen**

Die Zellen wurden 20 h in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von TGF- $\beta$  (0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 ng/ml) kultiviert und anschließend sowohl die Nitritakkumulation im Kulturüberstand als auch die Arginaseaktivität im Zelllysat bestimmt. Die Bildung von Nitrit diene als Maß für die Aktivität der iNOS, da das gebildete Produkt NO schnell zu Nitrit bzw. Nitrat oxidiert wird. Es zeigte sich, dass TGF- $\beta$  bereits ab einer Konzentration von 0,3 ng/ml eine signifikante Reduktion der Nitritakkumulation im Zellkulturüberstand hervorruft, die mit steigender TGF- $\beta$ -Konzentration stark zunimmt. Eine Beeinflussung der Arginaseaktivität blieb jedoch über den gesamten betrachteten Konzentrationsbereich aus (*Abb. 8A*).

### **1.2.2 Atemwegsfibroblasten**

Die Zellenansätze wurden ebenso mit oben genannten TGF- $\beta$ -Konzentrationen versetzt, und nach 40 h Inkubationszeit wurden iNOS-Aktivität über Nitritakkumulation sowie die Aktivität der Arginase bestimmt. In diesen Zellen konnte jedoch weder bei Betrachtung der Nitritakkumulation noch bei der Bestimmung der Arginaseaktivität durch TGF- $\beta$  eine signifikante Variation beobachtet werden (*Abb. 8B*).



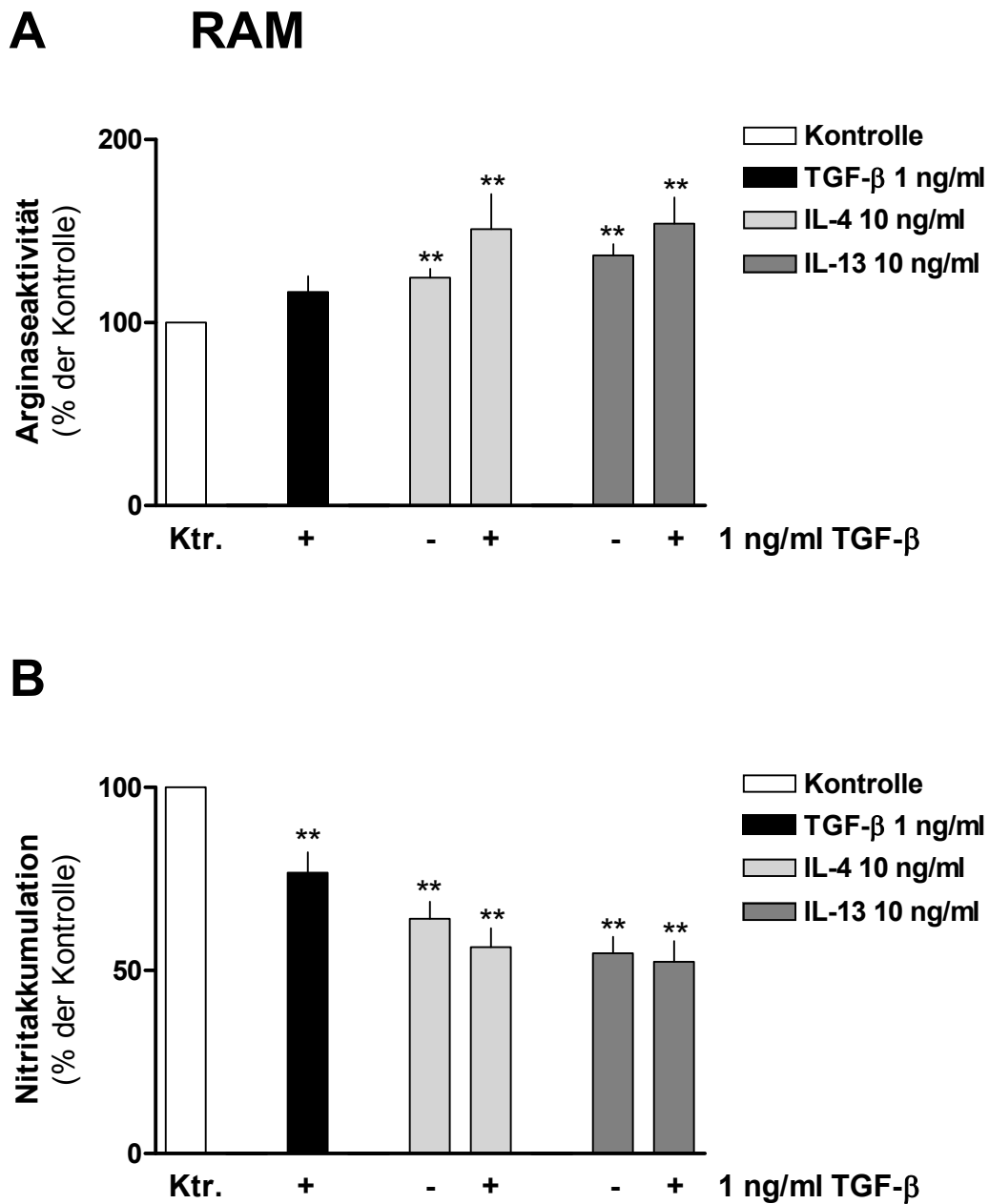
**Abb. 8:** Effekte von TGF- $\beta$  auf Arginaseaktivität und Nitritakkumulation. (A) Alveolarmakrophagen (RAM) wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (0,1-30 ng/ml) kultiviert. (B) Atemwegsfibroblasten (rFb) wurden 40 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (0,1-30 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde aus dem Kulturüberstand die Nitritakkumulation gemessen und nach Zellyse die Arginaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5-25). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,001; \*\* P < 0,0001.

### **1.3 Beeinflussung des TGF- $\beta$ -Effekts auf die Arginaseaktivität durch verschiedenartige Kosignale**

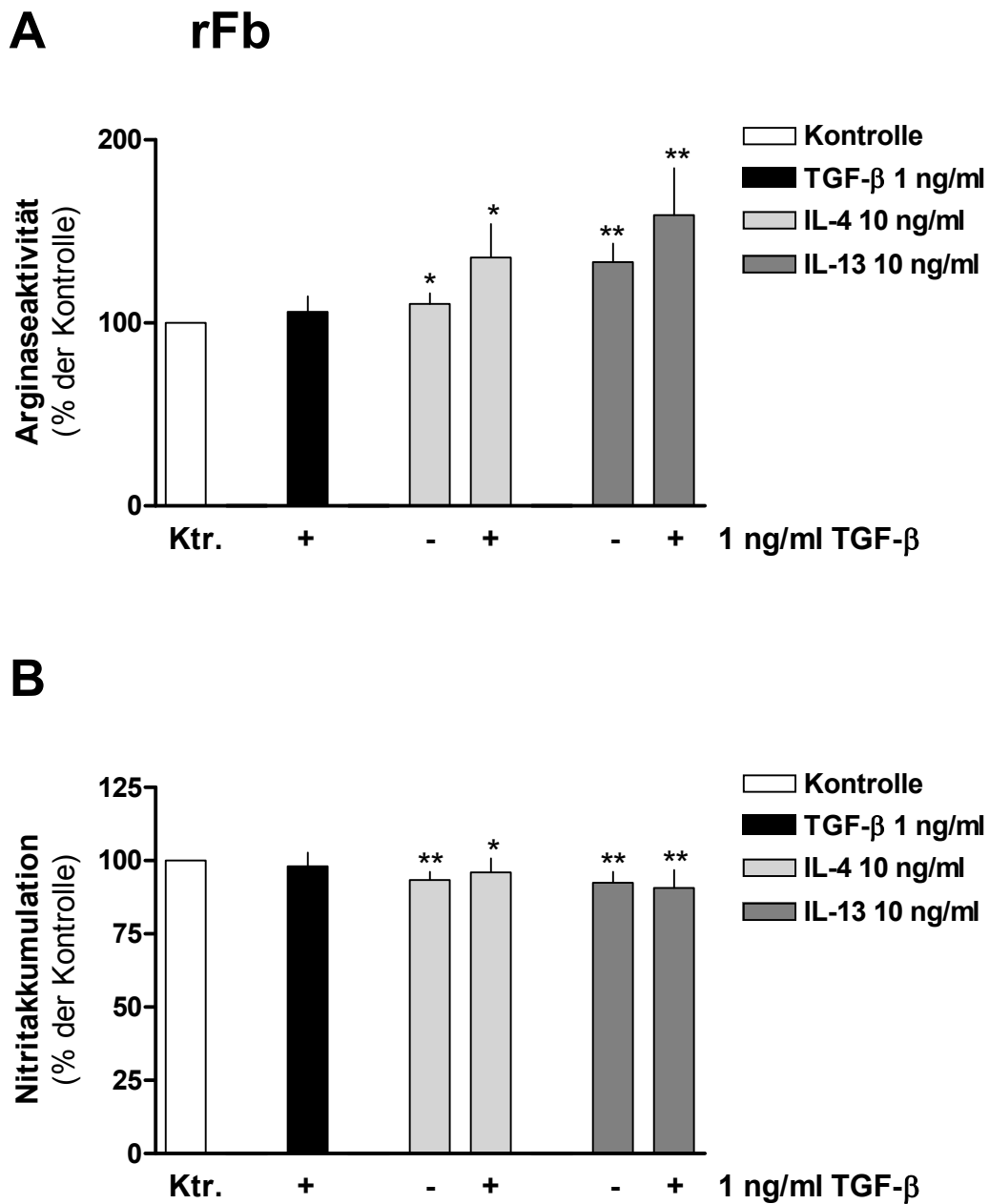
#### **1.3.1 Kombination mit IL-4 und IL-13**

Für Th<sub>2</sub>-Zytokine, besonders die proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13, wurde gezeigt, dass sie eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas einnehmen (Wills-Karp 1999). In Atemwegsfibroblasten üben IL-4 und IL-13 eine aktivitätssteigernde Wirkung auf die Arginase (Lindemann und Racké 2003) sowie eine Hemmwirkung auf die iNOS-Expression (Lindemann et al. 2004) aus. In RAW 264.7, einer Makrophagenzelllinie der Maus, wurde ein synergistischer Effekt von IL-4 und IL-13 mit TGF- $\beta$  nachgewiesen (Barksdale et al. 2004). Um der Frage nachzugehen, ob ein Effekt des TGF- $\beta$  auf Arginase- und iNOS-Aktivität erst bei Anwesenheit proinflammatorisch wirksamer Stimuli auftritt, wurden sowohl die primären Alveolarmakrophagen (20 h Inkubation) als auch die primären Atemwegsfibroblasten (40 h Inkubation) der Ratte mit TGF- $\beta$  (1 ng/ml) in Kombination mit dem jeweiligen Interleukin (10 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde die Nitritakkumulation im Kulturüberstand sowie die Arginaseaktivität im Zelllysate bestimmt.

Eine signifikante Aktivitätsmodifikation der beiden Enzyme konnte durch Kombination des TGF- $\beta$  mit den beiden Interleukinen IL-4 und IL-13 in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen nicht erzielt werden. Es wurden lediglich Tendenzen einer additiven Wirksamkeit erkennbar. Somit konnten die Befunde aus den RAW 264.7 weder an primären Alveolarmakrophagen (*Abb. 9*) noch an primären Atemwegsfibroblasten (*Abb. 10*) der Ratte bestätigt werden.



**Abb. 9:** Effekte der Kombination von TGF- $\beta$  mit IL-4 bzw. IL-13 auf die Arginaseaktivität in primären Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) und IL-4 (10 ng/ml) bzw. IL-13 (10 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde (A) aus dem Zellysate die Arginaseaktivität und (B) aus dem Kulturüberstand die Nitritakkumulation bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert + SEM, n = 6-16). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \*\* P < 0,001

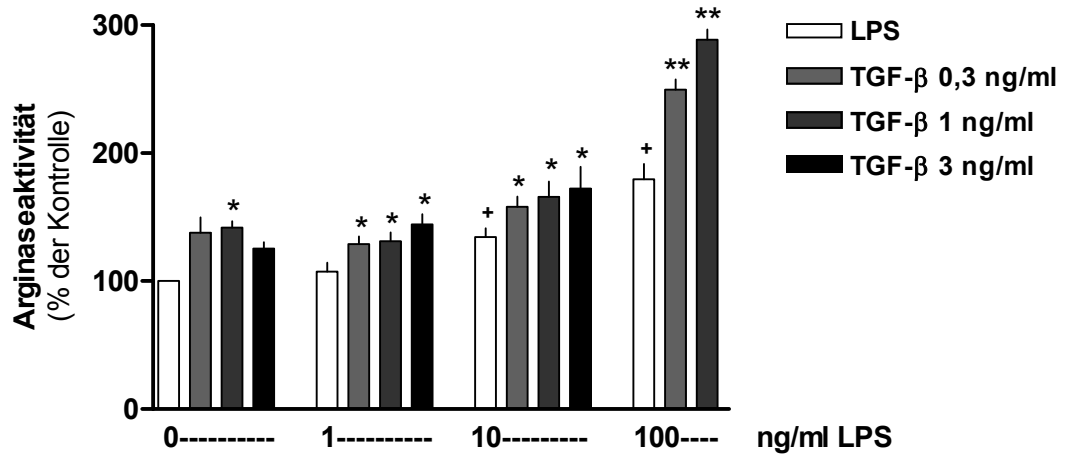
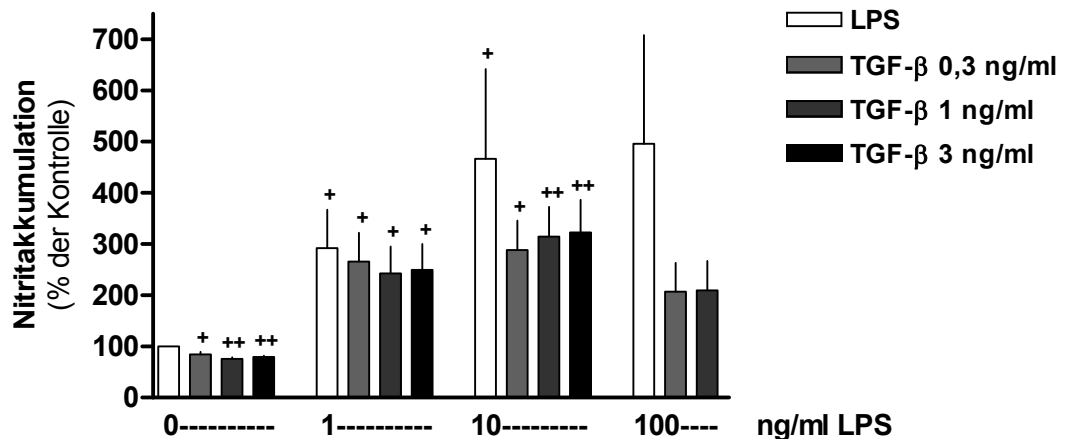


**Abb. 10:** Effekte der Kombination von TGF- $\beta$  mit IL-4 bzw. IL-13 auf die Arginaseaktivität in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte. Die Zellen wurden 40 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) und IL-4 (10 ng/ml) bzw. IL-13 (10 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde (A) aus dem Zellysate die Arginaseaktivität und (B) aus dem Kulturüberstand die Nitritakkumulation bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert + SEM, n = 6-16). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,01, \*\* P < 0,005

### 1.3.2 Kombination mit LPS

Ebenso wie IL-4 und IL-13 wirken auch bakterielle Endotoxine, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), als proinflammatorischer Stimulus. LPS stellt einen effektiven Induktor sowohl der Arginase- als auch der iNOS-Aktivität dar. Zur Gewinnung näherer Erkenntnisse über die Wirkung des TGF- $\beta$  auf die Arginaseaktivität in diesem Entzündungsmodell, wurden die primären Alveolarmakrophagen 20 h mit einer Kombination des TGF- $\beta$  (0,3; 1 oder 3 ng/ml) mit steigenden Konzentrationen des LPS (0-1000 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurden deren Arginaseaktivität im Zellysate und die Nitritakkumulation im Kulturüberstand ermittelt. Da Fibroblasten keine TLR 4-Rezeptoren tragen, deren Agonist LPS darstellt, war hier nicht mit einer Wirkung zu rechnen und wurde auch mit hohen LPS-Konzentrationen (1  $\mu$ g/ml) nicht beobachtet. Aus diesem Grund wurde diese Versuchsreihe nur an den Alveolarmakrophagen durchgeführt.

Es wurde deutlich, dass LPS die TGF- $\beta$ -Wirkung auf die Aktivität der Arginase bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml, die selbst noch keinen Effekt zeigt, signifikant zu stimulieren vermag, wobei die Steigerung mit zunehmender LPS-Konzentration noch ausgeprägter war (*Abb. 11A*). Auch die Hemmung der NO-Produktion durch TGF- $\beta$  war nach LPS-Stimulation deutlich intensiviert, wobei die statistische Signifikanz der iNOS-Inhibition auf Grund ausgeprägter Schwankungen zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen, insbesondere in den LPS-Ansätzen, nicht feststellbar war (*Abb. 11B*).

**A****B**

**Abb. 11:** Effekte der Kombination von TGF- $\beta$  mit LPS auf die Arginaseaktivität und die Nitritakkumulation in primären Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (0,3-3 ng/ml) und LPS (1-1000 ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde aus dem Zelllysat die Arginaseaktivität (A) und aus dem Kulturüberstand die Nitritakkumulation (B) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert + SEM, n = 6-13). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: + P < 0,05, ++ P < 0,01; verglichen mit der jeweiligen LPS-Konzentration: \* P < 0,05, \*\* P < 0,01.



#### **1.4 Analyse der funktionellen Koaktivität von TGF- $\beta$ und LPS auf Expressionsebene**

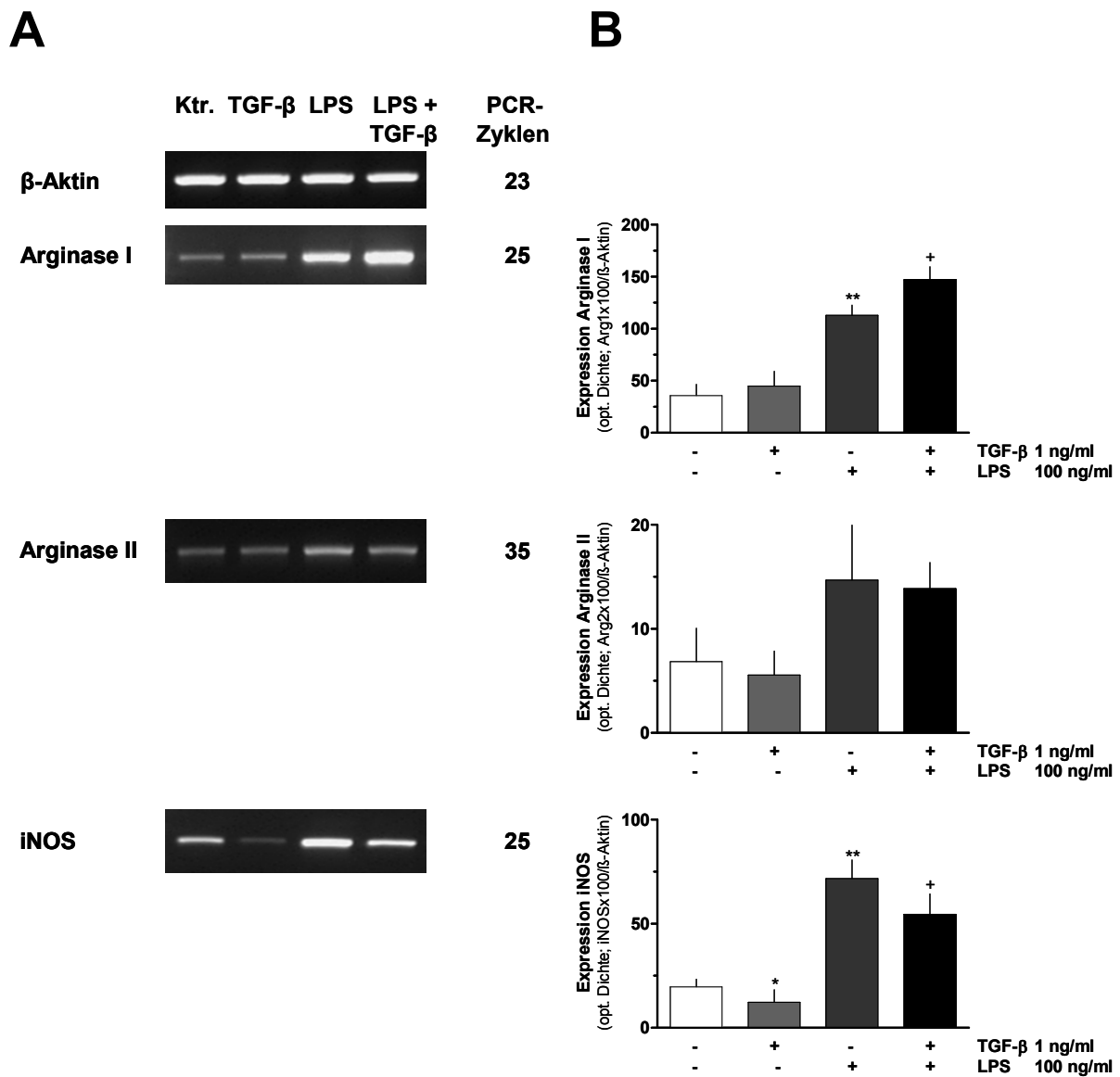
Um die auf funktioneller Ebene gewonnenen Erkenntnisse zur Wirkung von TGF- $\beta$  und LPS zu vertiefen, wurden mRNA-Expressionsanalysen mit spezifischen Primerpaaren für Arginase I und II, iNOS sowie für das konstitutiv exprimierte Strukturgen  $\beta$ -Aktin, das hier als Kontrolltranskript dient, durchgeführt. Somit konnte die Qualität der RNA-Präparation und der anschließenden cDNA-Synthese beurteilt und präparativ bedingte Schwankungen innerhalb der zu vergleichenden Proben ausgeglichen werden.

Vor der RNA-Präparation wurden die primären Alveolarmakrophagen der Ratte 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) und bzw. oder LPS (100 ng/ml) kultiviert. Als Positivkontrollen dienten aus Alveolarmakrophagen gewonnene RNA-Präparationen vorangegangener Versuche.

Aus *Abbildung 12A* wird erneut ersichtlich, dass in Alveolarmakrophagen, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, mRNA für beide Arginase-Isoenzyme, iNOS und das Kontrolltranskript  $\beta$ -Aktin nachgewiesen werden konnten.

Die semiquantitative Auswertung der optischen Dichte der Banden auf den Agarosegelen ermöglichte die in *Abbildung 12B* gezeigte Zusammenfassung und statistische Auswertung der Versuchsergebnisse mehrerer unabhängiger Zellpräparationen.

Kultivierung in Anwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) führte zu einer signifikanten Hemmung der Expression der iNOS, blieb jedoch ohne Effekt auf die Expression der Arginase-Isoenzyme. Im Gegensatz dazu verursachte LPS (100 ng/ml) bei den drei betrachteten Enzymen eine 2-3fache Verstärkung der Expression im Vergleich zum Ausgangsniveau. Diese konnte durch Kombination von TGF- $\beta$  mit LPS im Falle der Arginase I zusätzlich gesteigert werden, blieb bei Arginase II nahezu konstant und zeigt bei iNOS eine deutliche Hemmung.



**Abb. 12:** Effekte der Kombination von TGF- $\beta$  mit LPS auf die Expression der Arginase-Isoenzyme und iNOS in primären Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) und LPS (100 ng/ml) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt (A). Mittels Bestimmung der optischen Dichte der PCR-Banden wurden mehrere unabhängige Versuche semiquantitativ ausgewertet (B). Die Ergebnisse sind dargestellt als Quotient der optischen Dichten der untersuchten Transkripte mit den entsprechenden Werten des Kontrolltranskripts  $\beta$ -Aktin (Mittelwert + SEM, n = 3-6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,05, \*\* P < 0,01; verglichen mit der nur mit LPS-behandelten Probe: + P < 0,05.

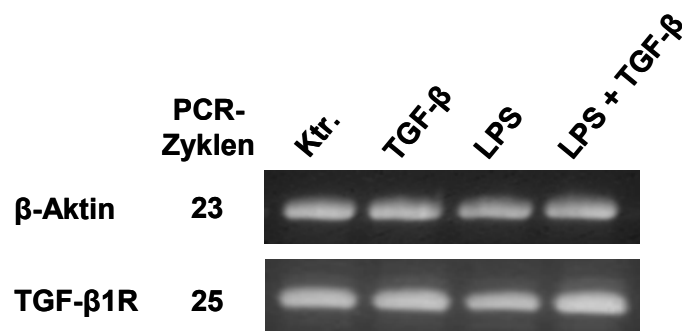
## 1.5 Mechanistische Analyse der Koaktivität von TGF- $\beta$ und LPS

Aus den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass der durch LPS gesteigerte TGF- $\beta$ -Effekt auf die Arginaseaktivität sich auf mRNA-Ebene widerspiegelt. Um nun in diesem Zusammenhang weitere regulative Prozesse zu beleuchten, wurde einerseits die Expression der TGF- $\beta$  1-Rezeptoren analysiert. Andererseits wurden Histonacetylierungs- und -deacetylierungsprozesse als mögliche Ursache betrachtet.

### 1.5.1 Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren

Eine einfache Erklärung der gesteigerten TGF- $\beta$  Wirkung wäre eine Stimulierung der Expression der TGF- $\beta$  1-Rezeptoren durch LPS. Zur Überprüfung wurden primäre Alveolarmakrophagen der Ratte 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) und bzw. oder LPS (100 ng/ml) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurden RT-PCR-Experimente mit spezifischen Primern für TGF- $\beta$  1-Rezeptoren durchgeführt.

Nach visueller und densitometrischer Auswertung der erhaltenen Bandenmuster war jedoch kein einheitliches Regulationsmuster in der Expression der TGF- $\beta$  1-Rezeptoren erkennbar (Abb. 13). Somit konnte ein Effekt des LPS auf die Dichte der TGF- $\beta$  1-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 13:** LPS-Effekt auf die Expression der TGF- $\beta$  1-Rezeptoren primärer Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (1 ng/ml) und LPS (100 ng/ml) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt.

### 1.5.2 Modifikationen an Chromatinstrukturen mit Einfluss auf die Transkription

Bei Acetylierungsprozessen und Deacetylierungen an Histonkomplexen handelt es sich um Mechanismen zur Kontrolle der Genexpression. Katalysiert werden diese Prozesse durch Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetyltransferasen (HATs). Die Acetylierung der Histone stellt eine posttranslationelle Modifikation der Proteine dar und führt zu einem Verlust positiver Ladung. Die Folge ist eine erleichterte Zugänglichkeit der histonassoziierten DNA-Abschnitte für Transkriptionsfaktoren. In RAW 264.7 ist eine stimulatorische Wirkung des LPS auf die Histonacetylierung am mkp-M-Promotor gezeigt worden (Musikacharoen et al. 2003). Vor diesem Hintergrund war von Interesse, ob der Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Arginaseaktivität und -expression durch LPS-Effekte auf den Acetylierungszustand der Histone begünstigt wird, so dass Substanzen eingesetzt wurden, die eine Wirkung auf Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen zeigen.

**Trichostatin A (TSA)** stellt einen häufig verwendeten HDAC-Inhibitor dar. Indirekt werden also durch TSA Acetylierungsprozesse und somit auch Transkriptionsvorgänge erleichtert. Jedoch blieb nach 20 h Inkubationszeit mit TSA (3-30 nM) ein fördernder Effekt auf die LPS-vermittelte Aktivitätserhöhung der Arginaseaktivität in den primären Alveolarmakrophagen der Ratte aus. Der Einsatz höherer TSA-Konzentrationen war nicht möglich, da bereits in diesen Versuchsansätzen zytotoxische Reaktionen zu beobachten waren.

Über **Theophyllin** wird berichtet, dass der molekulare Mechanismus seiner antiinflammatorischen Wirkung, auf Aktivierung von HDACs zurückzuführen ist (Ito et al. 2002). Folglich könnten Transkriptionsprozesse durch Theophyllin inhibiert werden. Jedoch konnte nach 20 h Inkubationszeit kein antagonisierender Effekt des Theophyllin (1; 10 oder 30  $\mu$ M) auf die arginaseaktivitätssteigernde LPS-Wirkung (10 oder 100 ng/ml) in primären Rattenalveolarmakrophagen beobachtet werden.

**Anacardic Acid (AnA)** ist ein zellpermeables Salicylsäurederivat aus der Schale der Cashewnuss und ein potenter, nicht-kompetitiver HAT-Inhibitor mit besonderer Spezifität gegenüber p300 und *p300/CBP-associated factor* (PCAF; Balasubramanyam et al. 2003).

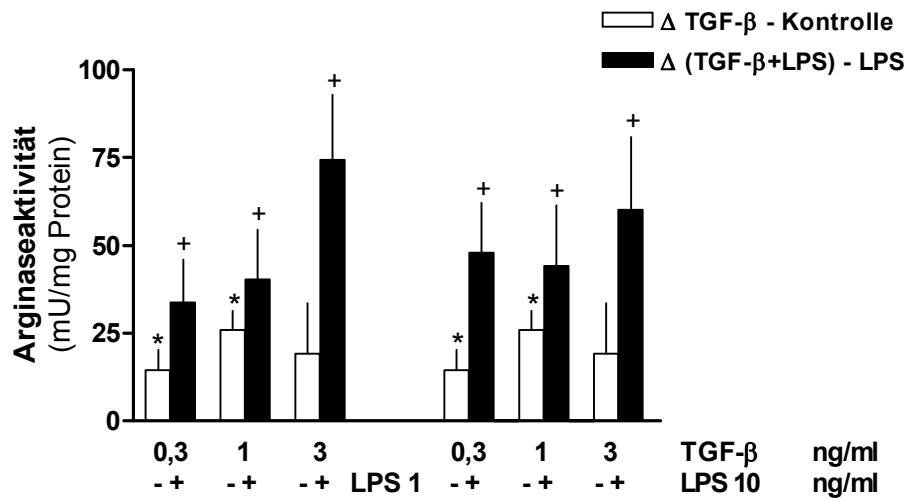
In Analogie zu den vorangegangenen Versuchsreihen wurden die primären Alveolarmakrophagen der Ratte 20 h mit Anacardic Acid (10 oder 30  $\mu\text{M}$ ), kombiniert mit LPS (10 ng/ml), in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (0,3; 1 oder 3  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder für eine Gewinnung der Gesamt-RNA gefolgt von mRNA-Expressionsanalysen oder für die Bestimmung der Arginaseaktivität lysiert.

Anacardic Acid unterdrückte in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  sowohl die LPS-vermittelte Induktion der Arginaseaktivität (*Abb. 14B*) als auch den durch LPS geförderten TGF- $\beta$ -Effekt (*Abb. 15*). In gleicher Weise wurde die Expression der Arginase I beeinflusst (*Abb. 16*).

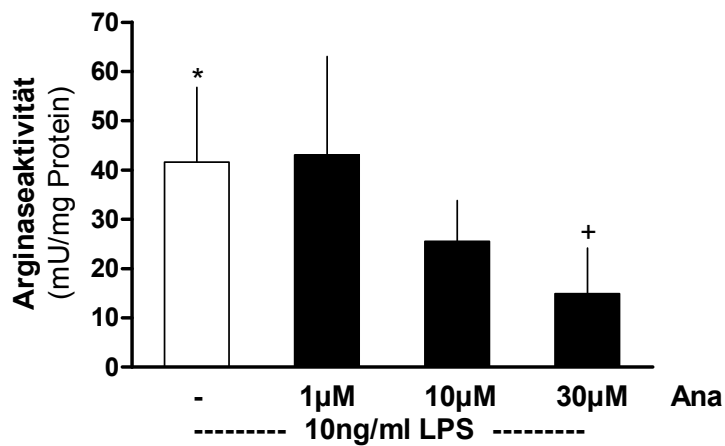
Zur exakteren Darstellung (*Abb. 14A und 15*) wurde jeweils der TGF- $\beta$ -vermittelte Anteil am Gesamteffekt ermittelt. Zur Berechnung wurde jeweils die Differenz der Assayergebnisse zwischen TGF- $\beta$ -haltiger Probe und der jeweiligen Referenzprobe gebildet und diese Ergebnisse in den Graphiken abgebildet.

Wie bereits in *Abbildung 11* dargestellt, wird auf diese Weise in *Abbildung 14A* nocheinmal verdeutlicht, dass LPS bereits in niedrigen und halbmaximalen Konzentrationen den TGF- $\beta$ -Effekt massiv, teilweise um das dreifache, zu steigern vermag. Obgleich TGF- $\beta$  alleine in dieser Versuchsreihe bereits einen leichten Eigeneffekt auf die Aktivität der Arginase aufwies, wurde diese in Anwesenheit der Kombination von TGF- $\beta$  mit LPS stark gefördert. Diese zusätzliche Förderung der Arginaseaktivität erwies sich als empfindlich gegenüber der Behandlung mit dem HAT-Inhibitor Anacardic Acid. Eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  rief bereits eine tendenzielle Senkung des LPS-vermittelten TGF- $\beta$ -Effekts hervor, ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  blieb die Kombination mit LPS nahezu wirkungslos.

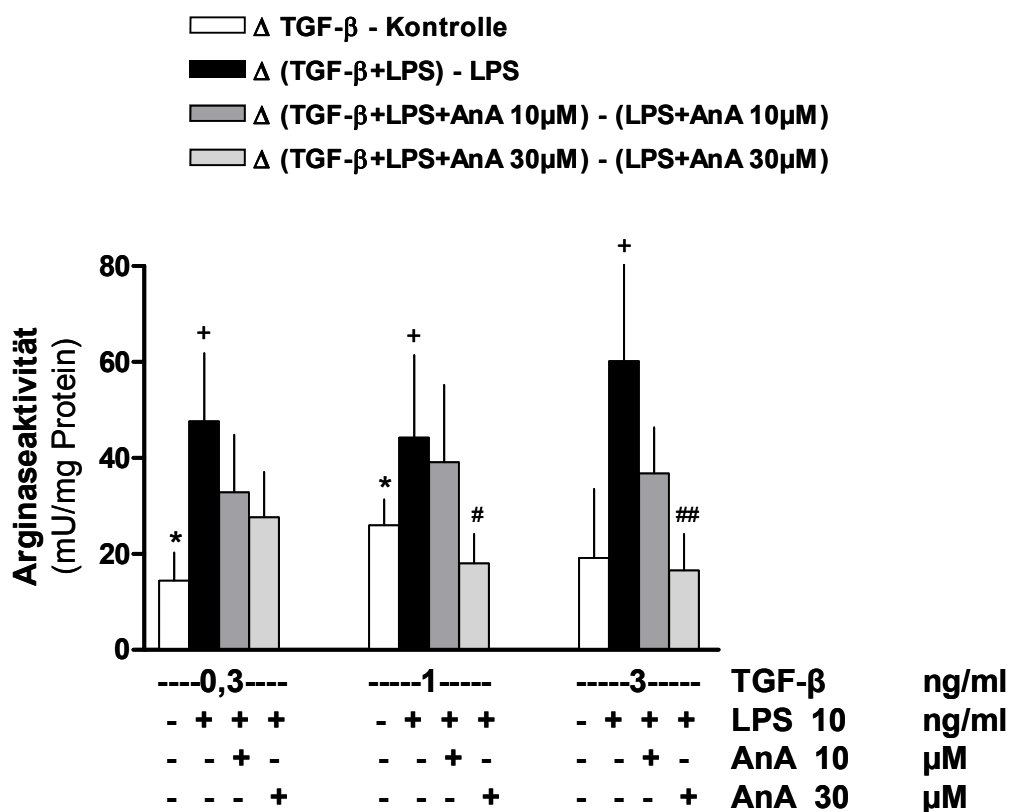
**A**



**B**

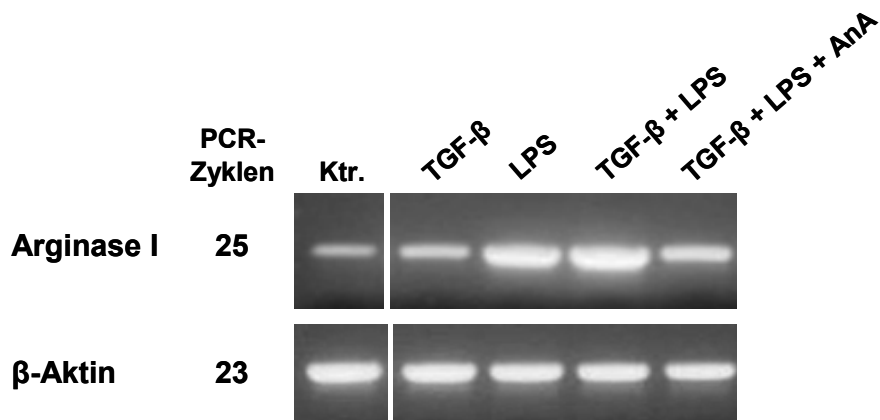


**Abb. 14:** (A) Effekte der Kombination von TGF-β mit LPS auf die Arginaseaktivität in primären Alveolarmakrophagen der Ratte. (B) Hemmung des LPS-induzierten Anstiegs der Arginaseaktivität durch Anacardic Acid. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF-β (0,3-3 ng/ml), LPS (1 oder 10 ng/ml) und Anacardic Acid (1-30 μM) kultiviert. Anschließend wurde aus dem Zellysate die Arginaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Arginaseunits pro mg Protein (Mittelwert + SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,05; verglichen mit TGF-β alleine: + P < 0,05, verglichen mit LPS alleine: + P < 0,05

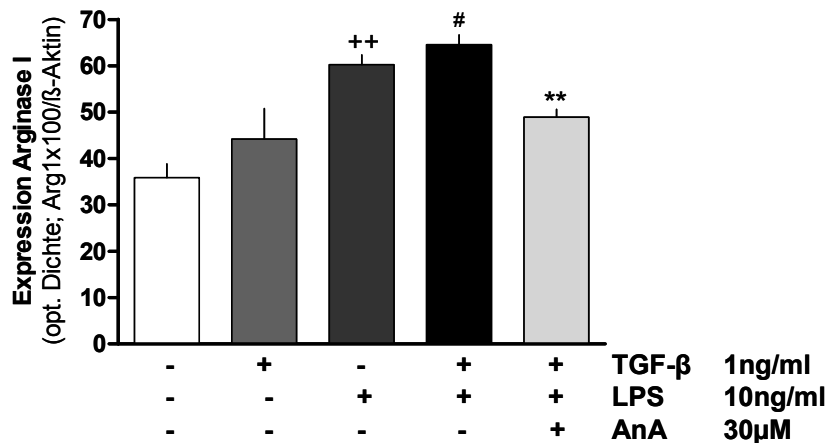


**Abb. 15:** Hemmender Effekt der Anacardic Acid (AnA) auf den durch LPS stimulierten TGF- $\beta$ -Effekt auf die Aktivität der Arginase in primären Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (0,3-3 ng/ml), LPS (10 ng/ml) und Anacardic Acid (10 oder 30  $\mu$ M) kultiviert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Arginaseunits pro mg Protein (Mittelwert + SEM, n = 6). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,05; verglichen mit dem alleinigen TGF- $\beta$ -Effekt: + P < 0,05; verglichen mit TGF- $\beta$ -Behandlung in Anwesenheit von LPS: # P < 0,05, ## P < 0,01.

## A



## B



**Abb. 16:** Effekt der Anacardic Acid auf den durch LPS stimulierten TGF- $\beta$ -Effekt auf die Expression der Arginase I in primären Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  (0,3-3 ng/ml), LPS (10 ng/ml) und Anacardic Acid (10 oder 30  $\mu$ M) kultiviert. (A) Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt. (B) Mittels Bestimmung der optischen Dichte der PCR-Banden wurden mehrere unabhängige Versuche semiquantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind dargestellt als Quotient der optischen Dichten der untersuchten Transkripte mit den entsprechenden Werten des Kontrolltranskripts  $\beta$ -Aktin (Mittelwert + SEM, n = 5). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: ++ P < 0,001; verglichen mit der LPS-behandelten Probe: # P < 0,05; verglichen mit TGF- $\beta$ -Behandlung in Anwesenheit von LPS: \*\* P < 0,001.



## **2 Untersuchung zur funktionellen Bedeutung der Arginase in primären Atemwegsfibroblasten**

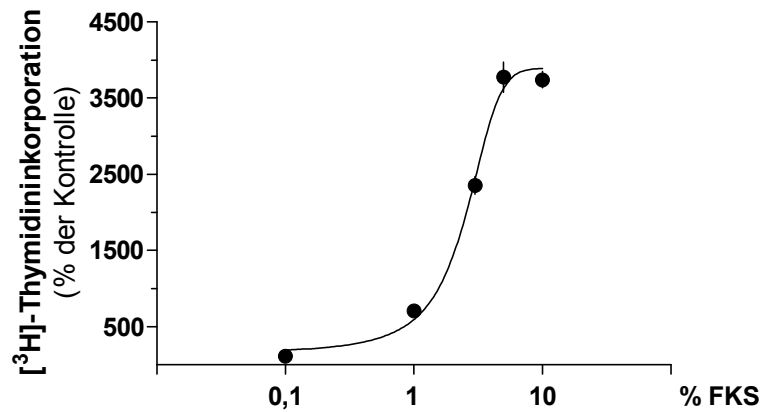
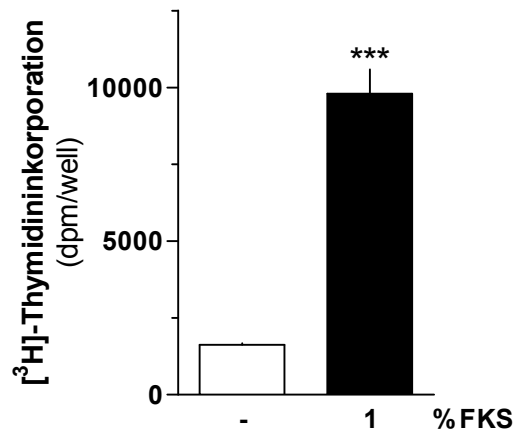
Primäres Produkt, das während der Umsatzreaktion des *L*-Arginin durch die Arginase bereitgestellt wird, ist *L*-Ornithin. Diese Aminosäure stellt die Vorstufe für die Synthese der Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin einerseits als auch andererseits von *L*-Prolin dar, was beides im Verlauf chronisch entzündlicher Reaktionen und damit verbundener Remodeling-Prozesse bedeutsam sein dürfte. Um den Beitrag der Arginase zu diesen profibrotischen Vorgängen bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen zu ermitteln, wurde der Einfluss funktioneller Veränderungen im Arginasestoffwechsel auf Polyamin- und Prolinsynthese und somit auf Proliferationsverhalten und Kollagensynthese der Atemwegsfibroblasten der Ratte untersucht.

### **2.1 Proliferation**

#### **2.1.1 Einfluss der Serumkonzentration**

Zunächst wurde zum Entwurf eines geeigneten Versuchsprotokolls der Einfluss des Serums auf das Proliferationsverhalten der Atemwegsfibroblasten betrachtet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen im Anschluss an eine 24stündige Hungerphase weitere 24 h mit aufsteigenden Serumkonzentrationen (0,1; 1; 3; 5 und 10%) inkubiert. Im Resultat (*Abb. 17*) führte eine 1%ige FKS-Konzentration bereits zu einem hochsignifikanten Anstieg der Proliferation, die sich mit zunehmender Serumkonzentration steigerte und bei 5% FKS ihr Maximum erreichte.

Um die Proliferationsrate unter Kontrollbedingungen möglichst gering zu halten, wurde in allen folgenden Experimenten die Serumkonzentration im Kulturmedium reduziert.

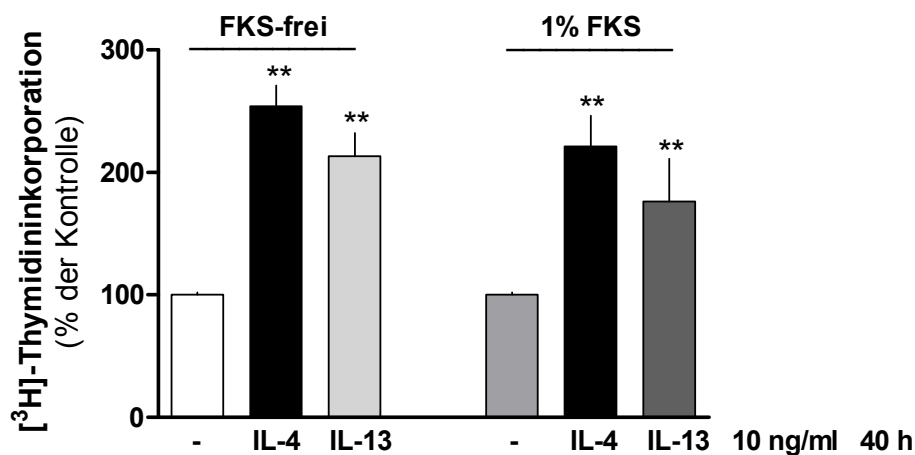
**A****B**

**Abb. 17:** Stimulatorischer Effekt auf die Proliferation der primären Atemwegs-fibroblasten durch Steigerung der Serumkonzentration. Die Zellen wurden nach 24stündiger Hungerphase 24 h in Anwesenheit steigender FKS-Konzentrationen (0,1; 1; 3; 5 oder 10%) und 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-Thymidin kultiviert. Anschließend wurde der Anteil neu synthetisierter DNA im Zelllysat quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt (A) in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchsansatzes oder (B) in dpm/Well (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 9). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \*\*\* P < 0,0001.

### 2.1.2 Einfluss der Interleukine IL-4 und IL-13

Wie bereits beschrieben, induzieren die Interleukine IL-4 und IL-13 eine Aktivitätserhöhung der Arginase. Somit kamen sie auch hier wieder zum Einsatz, um durch diesen positiven Stimulus eine hohe Arginaseaktivität zu gewährleisten und analysieren zu können, ob der zytokininduzierte Anstieg der Arginaseaktivität eine gesteigerte Proliferation nach sich zieht.

Abbildung 18 zeigt, dass nach 40 h Inkubation mit IL-4 (10 ng/ml) oder IL-13 (10 ng/ml) ein hochsignifikanter proliferationsfördernder Effekt sowohl unter serumfreien als auch unter 1% serumhaltigen Versuchsbedingungen auftrat. Die prozentuale Steigerung der Proliferation war unter 1% Serumzusatz leicht abgeschwächt, führte aber immer noch einer Verdoppelung der Proliferationsrate. Da die Vitalität der Zellen in allen Versuchsansätzen ausreichend hoch war, wurden alle folgenden Versuche nach Standardprotokoll unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, um in jedem Fall ein niedriges Ausgangsniveau bezüglich der Proliferationsrate zu gewährleisten.



**Abb. 18:** Proliferationsfördernde Effekte auf primäre Atemwegsfibroblasten durch IL-4 und IL-13. Atemwegsfibroblasten wurden 40 h mit IL-4 (10 ng/ml) oder IL-13 (10 ng/ml) inkubiert. 24 h vor der Zellyse wurde 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugesetzt. Anschließend wurde der Anteil neu synthetisierter DNA im Zellysat quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchsansatzes (Mittelwert + SEM, n = 12). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \*\* P < 0,001.

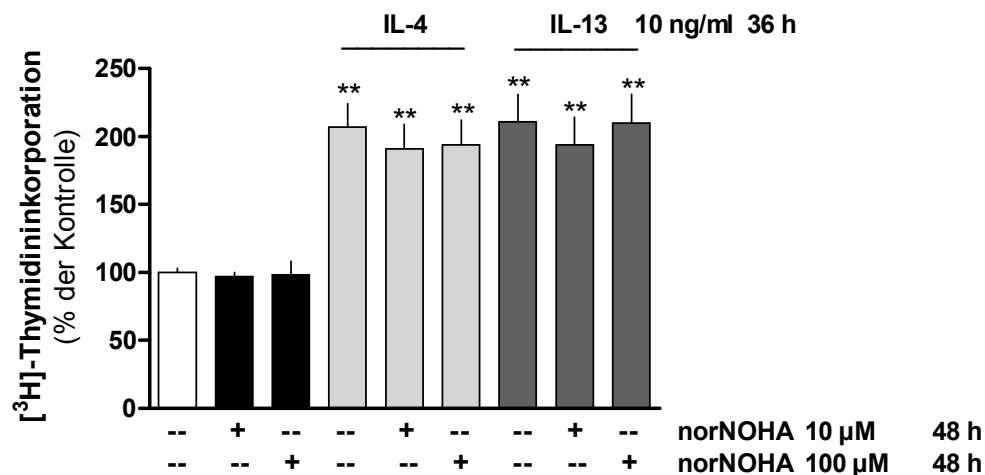
### **2.1.3 Einfluss der Arginaseinhibitoren norNOHA und BEC**

Um im nächsten Schritt den Beitrag der Arginase an den proliferativen Effekten zu analysieren, wurden zusätzlich zwei Arginaseinhibitoren eingesetzt. S-(2-Boronoethyl)-L-cystein (BEC) bindet eher schwach an das aktive Zentrum beider Arginase-Isoenzyme und konkurriert so mit dem Substrat L-Arginin um dessen Bindungsstelle. Bei N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-arginin (norNOHA) handelt es sich um einen potenten kompetitiven Inhibitor.

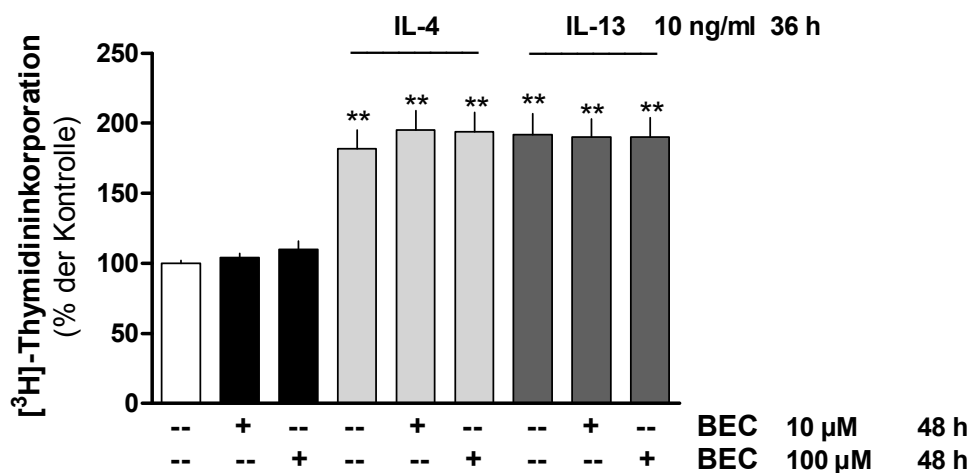
Die primären Atemwegsfibroblasten wurden 12 h mit den Arginaseinhibitoren (10 µM oder 100 µM) vorinkubiert, um anschließend 36 h mit der Kombination der Interleukine IL-4 (10 ng/ml) oder IL-13 (10 ng/ml) mit BEC oder norNOHA behandelt zu werden. 24 h vor der Zelllyse wurde 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugesetzt.

Wie aus *Abbildung 19* ersichtlich wird, konnte in keinem Versuchsansatz durch Arginaseinhibition ein antiproliferativer Effekt erzielt werden (n = 9-12). Der starke proliferationsfördernde Effekt der Interleukine war hingegen reproduzierbar und wurde durch Kombination und Vorinkubation mit norNOHA oder BEC nicht beeinflusst.

## A norNOHA



## B BEC



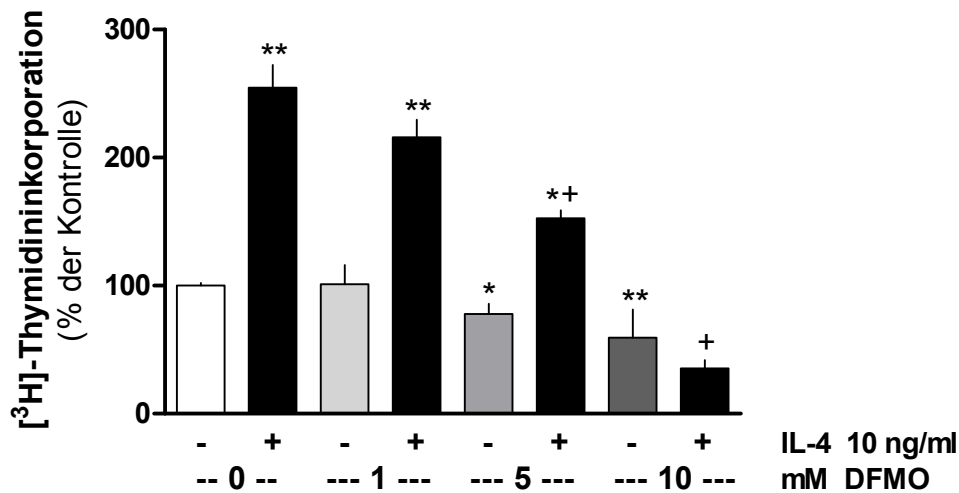
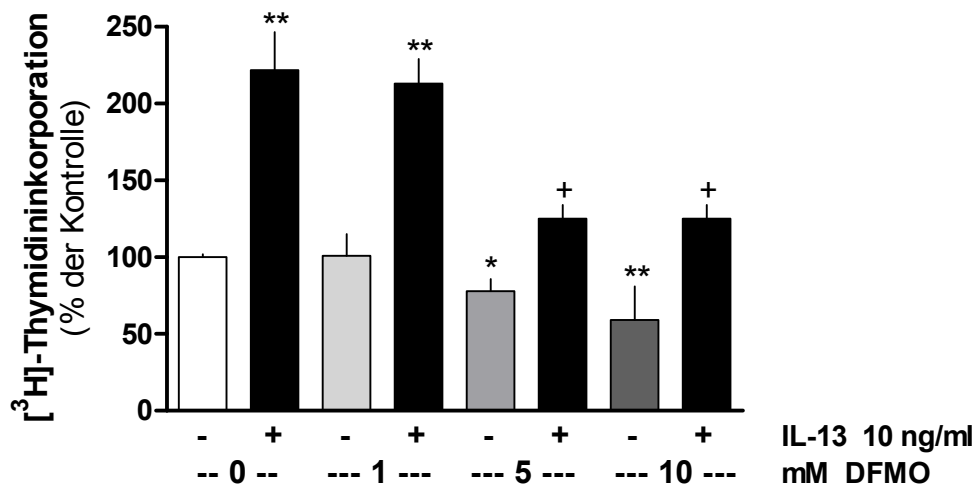
**Abb. 19:** Einfluss der Arginaseinhibitoren norNOHA (A) und BEC (B) auf die Proliferation primärer Atemwegsfibroblasten. Die Zellen wurden nach 12stündiger Vorinkubation mit norNOHA (10 oder 100 µM) oder BEC (10 oder 100 µM) 36 h in An- oder Abwesenheit von IL-4 (10 ng/ml) oder IL-13 (10 ng/ml) kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugesetzt. Anschließend wurde der Anteil neu synthetisierter DNA im Zelllysät quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchsansatzes (Mittelwert + SEM, n = 9-12). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \*\* P < 0,001.

#### **2.1.4 Einfluss des Ornithindecaboxylaseinhibitors DFMO**

Die Reaktion des *L*-Ornithin zu Putrescin wird katalysiert durch das Enzym Ornithindecaboxylase (ODC; siehe *Abb. 1*) und bestimmt in diesem Stoffwechselweg die Geschwindigkeit der Biogenese der Polyamine.  $\alpha$ -Difluoromethylornithin (DFMO) führt zu einer selektiven, irreversiblen Inhibition der ODC, so dass ihre Hemmung die Polyaminsynthese aus *L*-Ornithin reduziert und sich somit auf diesem Wege die Bedeutung sowohl der Polyamine als auch des *L*-Ornithins für proliferative Vorgänge demonstrieren lässt.

Primäre Atemwegsfibroblasten wurden 40 h in Anwesenheit von DFMO (1; 5 oder 10 mM) in Kombination mit den Interleukinen IL-4 (10 ng/ml) oder IL-13 (10 ng/ml) kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde 1  $\mu$ Ci [ $^3$ H]-Thymidin zugesetzt und anschließend die neu synthetisierte DNA quantifiziert.

Im Ergebnis führte die ODC-Inhibition konzentrationsabhängig ab einer DFMO-Konzentration von 5 mM zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation unter Kontrollbedingungen. Ebenfalls wurde ab einer DFMO-Konzentration von 5 mM die starke proliferationsfördernde Wirkung beider Interleukine deutlich unterdrückt, bei steigenden DFMO-Konzentrationen teils sogar unter das Kontrollniveau gesenkt (*Abb. 20*).

**A IL-4****B IL-13**

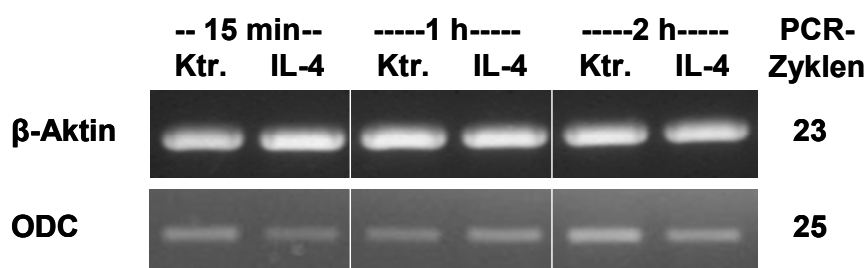
**Abb. 20:** Einfluss des ODC-Inhibitors DFMO auf die Proliferationssteigerung der primären Atemwegsfibroblasten durch die Interleukine IL-4 (A) und IL-13 (B). Die Zellen wurden 40 h in An- oder Abwesenheit von DFMO (1; 5 oder 10 mM), IL-4 (10 ng/ml) oder IL-13 (10 ng/ml) kultiviert. 24 h vor der Zellyse wurde 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugesetzt. Anschließend wurde der Anteil neu synthetisierter DNA im Zelllysate quantifiziert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen des jeweiligen Versuchsansatzes (Mittelwert + SEM, n = 6-10). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,01; \*\* P < 0,001; verglichen mit dem jeweiligen Interleukin alleine: + P < 0,01.

### 2.1.5 Einfluss des IL-4 auf die Expression der ODC

Da der proliferationsfördernde Effekt der Interleukine durch den ODC-Inhibitor antagonisiert wurde, scheint es wahrscheinlich, dass die eingesetzten Interleukine in vorgeschalteten Stoffwechselprozessen regulierend eingreifen. Ein expressions- und aktivitätssteigernder Effekt auf die Arginase wurde bereits nachgewiesen. Ergänzend wurde nun in molekularbiologischen Untersuchungen der Effekt des IL-4 auf die Expression der ODC näher betrachtet.

Zu diesem Zweck wurden primäre Atemwegsfibroblasten der Ratte verschiedene Zeitintervalle (15 min, 1 h und 2 h) mit IL-4 (10 ng/ml) inkubiert und auf Veränderungen in der Expressionsrate der mRNA des Enzyms untersucht.

Abbildung 21 stellt ein repräsentatives Ergebnisse der Expressionsanalyse mit spezifischen Primerpaaren gegen ODC und das Kontrolltranskript  $\beta$ -Aktin dar. Eine dynamische Regulation der Enzymexpression durch IL-4 ließ sich mit dieser Versuchsanordnung nicht nachweisen.



**Abb. 21:** IL-4-Effekt auf die Expression der ODC primärer Atemwegsfibroblasten der Ratte. Die Zellen wurden 15 min, 1 h oder 2 h in An- oder Abwesenheit von IL-4 (10 ng/ml) kultiviert. Nach anschließender Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit der angegebenen Zyklenzahl und den jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt.

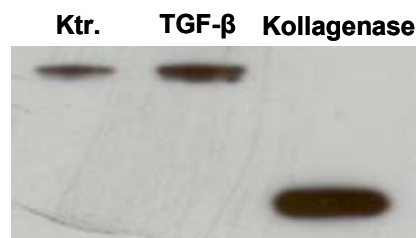


## 2.2 Kollagensynthese

Zur Gewinnung näherer Erkenntnisse, ob Arginase über die Bereitstellung von *L*-Ornithin als Vorläufer des *L*-Prolins die Regulation der Kollagensynthese beeinflusst, wurden Immunoblots mit Antikörpern gegen Kollagen 1 durchgeführt. Im Blickfeld lag bei diesen Experimenten das von der Zelle sezernierte Kollagen 1 im Kulturüberstand. TGF- $\beta$  (1 oder 5 ng/ml) wurde hierbei als bekannter Induktor der Kollagensynthese eingesetzt (Doherty und Broide 2007). Anschließend wurde analysiert, ob Arginaseinhibition durch norNOHA (100  $\mu$ M) hemmend in die Kollagensynthese eingreift.

Zu diesem Zweck wurden primäre Atemwegsfibroblasten der Ratte in prolinfreiem Medium kultiviert. 48 h vor der Proteinpräparation wurde ihnen nach mehrfachem sorgfältigem Spülen mit 1xPBS das Serum entzogen. Durch diese Maßnahmen sollte gewährleistet werden, dass der Zelle kein *L*-Prolin extern zugeführt wird. Die Zellen wurden zwei oder vier Tage unter Anwesenheit von TGF- $\beta$  bzw. norNOHA in Kultur gehalten. In den Versuchsansätzen, die einer vier Tage dauernden Inkubation unterworfen wurden, fanden die ersten 48 h unter serumhaltigen Bedingungen statt. Danach wurde, wie vorher beschrieben, auf serumfreies Kulturmedium umgestellt und weitere 48 h inkubiert, so dass die Sammelphase, während der Kollagen 1 ins Kulturmedium sezerniert wurde, in jedem Ansatz 48 h betrug. Anschließend wurden 10  $\mu$ l des Kulturüberstands der SDS-PAGE unterzogen und der Immunoblot mit dem Antikörper gegen Kollagen 1 durchgeführt.

Zur Verifikation des Antikörpers wurden während der Etablierungsphase einige Proteinpräparationen vor dem eigentlichen Immunoblot einem gezielten Kollagenabbau durch Kollagenase unterzogen. Das Ergebnis bestätigte die hohe Spezifität des Antikörpers für Kollagen 1 und damit dessen Eignung zur Detektion und Quantifizierung dieses Proteins. Außerdem konnte auf diesem Weg verdeutlicht werden, dass es sich bei den detektierten Banden tatsächlich um Kollagen handelt (siehe *Abb. 22*).

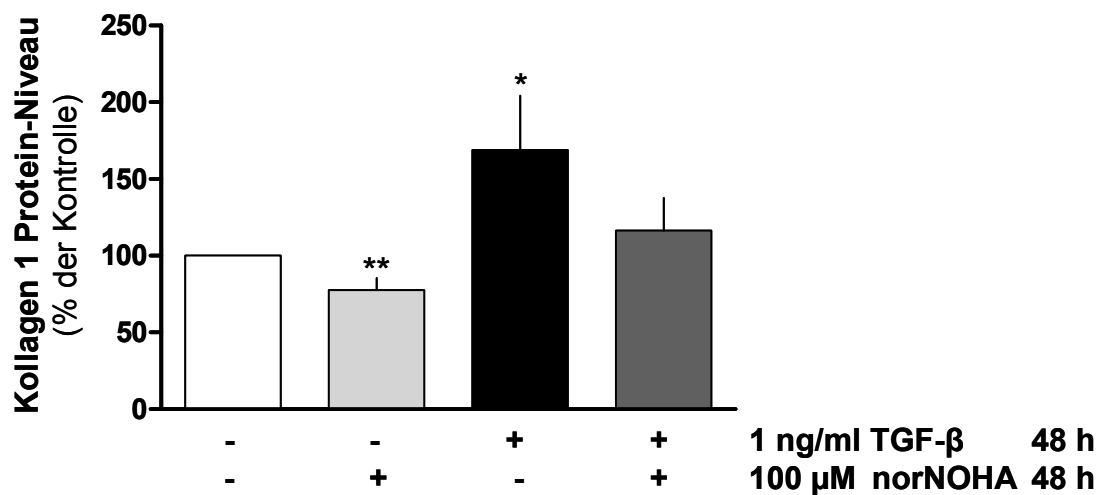


**Abb. 22:** Repräsentativer Immunoblot mit einem Antikörper gegen Kollagen 1 nach 4stündigem Kollagenaseverdau. Auf diese Weise konnte die Spezifität des Antikörpers gegen Kollagen 1 bestätigt werden.

Aus *Abbildung 23A* und *24A* wird ersichtlich, dass zweitägige Inkubation der Atemwegsfibroblasten mit TGF- $\beta$  1 ng/ml zu einer signifikanten Erhöhung der Kollagen 1-Konzentration im Kulturüberstand führte, die durch Verdoppelung der Inkubationszeit aber keine weitere Steigerung erfuhr. Hingegen war eine stärkere Kollagensekretion nach viertägiger Inkubation mit 5 ng/ml detektierbar.

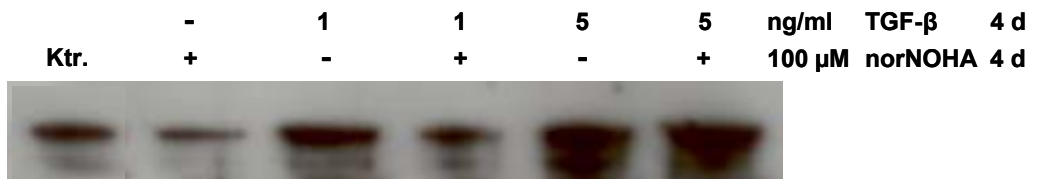
Arginaseinhibition durch norNOHA verursachte in jedem Versuchsansatz eine ausgeprägte Reduktion der Kollagensynthese. Durch die quantitative Auswertung der Proteinbanden durch Bestimmung der optischen Dichte ließ sich die Signifikanz der Kollagensynthesehemmung durch den Arginaseinhibitor berechnen (*Abb. 23B* und *24B*).

Wurden die Atemwegsfibroblasten zur gleichen Zeit sowohl mit TGF- $\beta$  als auch mit norNOHA inkubiert, war der Gehalt des Kulturüberstandes an Kollagen 1-Protein im Vergleich zur Inkubation mit TGF- $\beta$  alleine deutlich erkennbar reduziert. TGF- $\beta$  war in Anwesenheit des Arginaseinhibitors in keinem Fall mehr in der Lage eine signifikante Steigerung der Kollagensekretion hervorzurufen. Die TGF- $\beta$ -induzierte Amplifikation der Kollagensynthese wurde also durch norNOHA weitgehend aufgehoben.

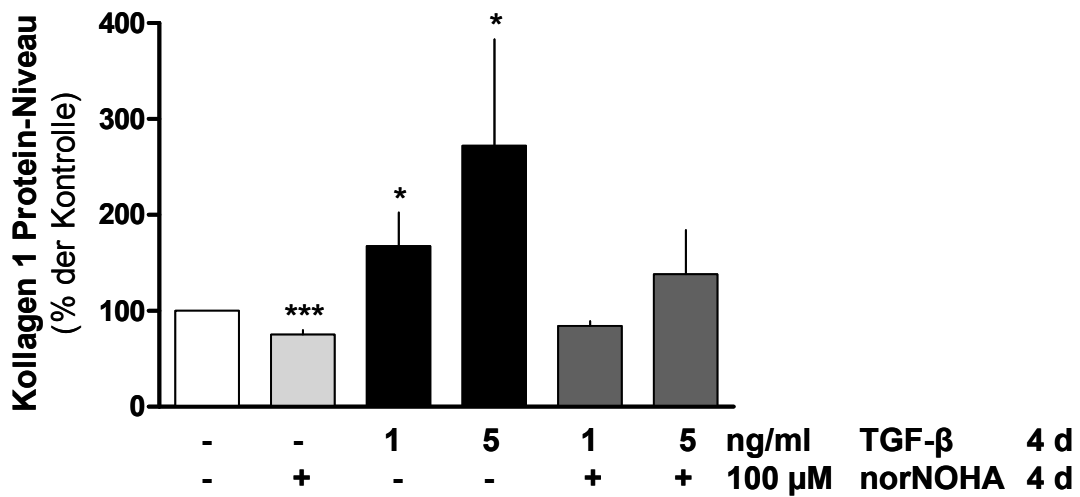
**A****B**

**Abb. 23:** Repräsentativer Immunoblot mit einem Antikörper gegen Kollagen 1 (A). Mittels Bestimmung der optischen Dichte der Proteinbanden wurden mehrere unabhängige Versuche quantitativ ausgewertet (B). Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert + SEM, n = 4-12). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,05, \*\* P < 0,01.

**A**



**B**



**Abb. 24:** Repräsentativer Immunoblot mit einem Antikörper gegen Kollagen 1 (A). Mittels Bestimmung der optischen Dichte der Proteinbanden wurden mehrere unabhängige Versuche quantitativ ausgewertet (B). Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent des Mittelwertes der Kontrollen der jeweiligen Zellpräparation (Mittelwert + SEM, n = 4-12). Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrolle: \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,0001.

## **E Diskussion**

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, konnte in der Vergangenheit eine ausgeprägte Erhöhung der Arginaseaktivität in Atemwegen und Lungengewebe muriner Asthmamodelle sowie in allergensensitisierten und -exponierten Meerschweinchen oder im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beobachtet werden (Meurs et al. 2002; Zimmermann et al. 2003; Endo et al. 2003). Somit entstanden Fragen nach der Lokalisation der Arginase-Isoenzyme in den Atemwegen, nach deren Expressions- und Aktivitätsregulation in den verschiedenen Zelltypen der Atemwege sowie nach der Beeinflussung der NO-Synthese in diesen Zellen, die sich aus der Konkurrenzsituation beider Enzymsysteme um das gemeinsame Substrat *L*-Arginin ergibt. Darüber hinaus steht die funktionelle Relevanz eines verschobenen Expressionsgleichgewichts im Mittelpunkt des allgemeinen Interesses, respektive die Beeinflussung von Zellwachstum und die Bereitstellung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, da die Verstoffwechslung des *L*-Arginins über die Arginase unter anderem in der Synthese von *L*-Prolin und Polyaminen mündet.

### **1 Aktivität und Expression der Arginase I und II sowie iNOS unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli**

#### **1.1 *Expressions- und Aktivitätsniveau der Arginase-Isoenzyme und der induzierbaren NO-Synthase in verschiedenen Zellsystemen der Atemwege***

Neben ihren zytotoxischen Eigenschaften im Zuge der angeborenen Immunabwehr vermitteln Alveolarmakrophagen durch die Bereitstellung einer Vielzahl von Zytokinen die Einleitung von Entzündungsreaktionen und der erworbenen Immunreaktion (Reynolds 2005). In diesem Zusammenhang gewinnt der Argininstoffwechsel zunehmend an Bedeutung. Hierbei stehen die beiden in Makrophagen

induzierbaren Enzyme iNOS und Arginase durch die Konkurrenz um das gemeinsame Substrat *L*-Arginin im Vordergrund. In vorangegangenen Studien wurden hohe Arginaseaktivitätslevel in Alveolarmakrophagen verschiedener Spezies, wie beispielsweise der Ratte (Hey et al. 1995; Klasen et al. 2001) oder des Kaninchens (Hammermann et al. 2000b), nachgewiesen. Dies konnte auch im Verlauf dieser Arbeit anhand primärer Alveolarmakrophagen der Ratte nachvollzogen werden. Des Weiteren konnte sowohl durch funktionelle Versuche auf Ebene der Enzymaktivität als auch durch Bestimmung der mRNA-Menge durch mRNA-Expressionsanalysen erneut nachgewiesen werden, dass in stimulierten und unstimulierten Alveolarmakrophagen der Ratte beide Arginase-Isoenzyme nebeneinander exprimiert werden, jedoch Arginase I deutlich stärker zur Gesamtaktivität beizutragen scheint (siehe auch Klasen et al. 2001). Ebenso wurde durch Messung der Nitritakkumulation an nichtstimulierten Alveolarmakrophagen der Ratte sowohl eine Grundaktivität der iNOS als auch ihre basale Expression auf Ebene der mRNA bestätigt.

Neben den oben genannten Alveolarmakrophagen stehen subepitheliale Fibroblasten sowohl durch Interaktionen untereinander als auch mit Entzündungs- oder Epithelzellen in engem Zusammenhang mit der Pathophysiologie des *Asthma bronchiale* (Johnson und Burgess 2004). In diesen Zellen erlangt der Argininstoffwechsel über die Bereitstellung von *L*-Ornithin durch die Arginase und in der Folge von *L*-Prolin und Polyaminen seine Bedeutung. Mit Hilfe der jeweiligen Enzymassays ist in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte sowohl basale Arginaseaktivität als auch Nitritakkumulation unter Kontrollbedingungen messbar, die jedoch im Vergleich zu den in Alveolarmakrophagen gemessenen Aktivitäten in beiden Fällen um den Faktor 10 niedriger ist. Auch der Vergleich der mRNA-Menge unstimulierter Zellen zeigt selbst in der semiquantitativen Auswertung ein deutlich geringeres Expressionsniveau von Arginase I und iNOS in den Fibroblasten. Unterschiede im Expressionmuster der Arginase II waren auf diesem Wege nicht detektierbar obgleich auch in den Atemwegsfibroblasten eine Grundexpression festgestellt werden konnte.

## **1.2 Induzierbarkeit der Arginase I und II sowie der iNOS durch TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  gilt als potenter Mediator struktureller und immunologischer Modulationen der Atemwege im Verlauf asthmatischer Prozesse, wie beispielsweise der subepithelialen Fibrose und der vermehrten Anzahl entzündungsassoziierter Zellen (Duvernelle et al. 2003; Bosse und Rola-Pleszczynski 2007). Die Quelle gesteigerter TGF- $\beta$ -Freisetzung im Asthmageschehen stellen besonders aktivierte Eosinophile dar, aber auch Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten zeigen bei Asthmatikern erhöhte TGF- $\beta$ -Expressionsraten im Vergleich zu gesunden Testpersonen (Duvernelle et al. 2003; Doherty und Broide 2007).

In Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Effekten des TGF- $\beta$  auf die Aktivität und Expression der iNOS in murinen Peritonealmakrophagen (Vodovotz et al. 1993; Hausmann et al. 1994) zeigen primäre Alveolarmakrophagen der Ratte ab einer Konzentration von 0,3 ng/ml eine signifikante Reduktion der Nitritakkumulation und somit der iNOS-Aktivität, die mit steigenden TGF- $\beta$ -Konzentrationen deutlich zunimmt. Die beobachtete Aktivitätsminderung spiegelt sich ebenfalls auf Ebene der mRNA wieder. Die semiquantitative RT-PCR illustriert eine deutliche Verringerung der iNOS-Expression durch TGF- $\beta$  in einer Konzentration von 1 ng/ml. In primären Atemwegsfibroblasten der Ratte wird im Gegensatz hierzu die Nitritakkumulation bzw. die iNOS-Aktivität durch TGF- $\beta$  über den gesamten betrachteten Konzentrationsbereich (0,3-3 ng/ml) nicht beeinflusst. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, die mit TGF- $\beta$  als alleinigem Stimulus keine Beeinflussung der iNOS-Expression, beispielsweise in murinen BALB/3T3- bzw. Swiss-3T3-Fibroblasten (Kleinert et al. 1996; Gilbert und Herschman 1993) oder Lungenfibroblasten der Ratte (Zhang und Phan 1999), herbeiführen konnten.

Ob die TGF- $\beta$ -induzierte Downregulation der iNOS-Aktivität in Makrophagen notwendigerweise einen Anstieg der Arginaseaktivität nach sich zieht, ist nicht sicher vorhersehbar. Durch Unterdrückung der iNOS-Aktivität entfällt jedoch die Generierung des Intermediates N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin (NOHA), dessen inhibierende

Wirkung auf die Arginase belegt ist (Hecker et al. 1995). Des Weiteren würde sich eine eventuelle Verbesserung der Substratverfügbarkeit möglicherweise positiv auf die Umsatzrate der Arginase auswirken, deren  $K_m$ -Werte sich im millimolaren Bereich bewegen (Kaysen und Strecker 1973), während die  $K_m$ -Werte der NO-Synthasen in Makrophagen für *L*-Arginin zwischen 3 und 30  $\mu\text{M}$  liegen (Stuehr et al. 1991; Yui et al. 1991).

In den primären Alveolarmakrophagen der Ratte vermag TGF- $\beta$  jedoch im Gegensatz zu den bekannten stimulatorischen Effekten in primären Peritonealmakrophagen der Ratte (Boutard et al. 1995) über den gesamten Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 30 ng/ml keine signifikante Änderung der Arginaseaktivität zu verursachen, und auch die semiquantitative Analyse der mRNA-Menge von Arginase I und II mittels mRNA-Expressionsanalyse lässt keine Aussage über eine Beeinflussung des Aktivitätsniveaus durch TGF- $\beta$  zu. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in der Analyse der primären Atemwegsfibroblasten, denn auch hier bleibt die erwartete Aktivitäts- und Expressionssteigerung der Arginase durch Inkubation mit TGF- $\beta$  aus. Somit scheinen in diesem Zusammenhang die beiden Enzymsysteme einer voneinander unabhängigen Regulation zu unterliegen. Die beobachteten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Studien an Peritonealmakrophagen der Ratte (Boutard et al. 1995) und primären Fibroblasten der Ratte aus Wundgewebe, die im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten bereits eine erhöhte Grundaktivität der Arginase aufweisen (Witte et al. 2002). In diesen beiden Studien konnte bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml durch TGF- $\beta$  eine signifikante Steigerung des Aktivitäts- bzw. des Expressionsniveaus der Arginase, insbesondere der Arginase I, hervorgerufen werden.

Neben der konstitutiven Expression unterliegt die Arginaseaktivität in Makrophagen zusätzlich einer intensiven Regulation durch verschiedene Stimuli, wie beispielsweise LPS und Glucocorticoiden (Hey et al. 1995; Klasen et al. 2001) oder Phosphodiesteraseinhibitoren (Hammermann et al. 2000b; Koschorreck et al. 2003). Th<sub>2</sub>- und Th<sub>1</sub>-Zytokine führen in Knochenmarksmakrophagen der Maus zu einer reziproken Regulation von iNOS und Arginase-Isoenzymen (Modolell et al. 1995), wohingegen eine Immunstimulation durch LPS eine intensive Koinduktion beider Enzymsysteme nach sich zieht (Klasen et al. 2001; Mori und Gotoh 2004). Die Th<sub>2</sub>-



Zytokine IL-4 und IL-13 spielen ebenso wie TGF- $\beta$  in der Pathophysiologie des *Asthma bronchiale* eine zentrale Rolle (siehe auch *Einleitung Kap. 2.1*). In den hier verwendeten Atemwegsfibroblasten rufen sowohl IL-4 als auch IL-13 eine signifikante Induktion der Arginase und eine ebenso signifikante Downregulation der iNOS-Aktivität und Expression hervor (siehe auch Lindemann und Racké 2003 und Lindemann et al. 2004). Daneben wurde besonders am Beispiel des TGF- $\beta$  in zahlreichen Studien veranschaulicht, dass Zytokine ihre Wirksamkeit häufig erst in Kombination mit geeigneten Kostimuli vollends entfalten. So erfährt die Arginase in RAW 264.7 durch die Dreifachkombination von IL-4 und IL-13 mit TGF- $\beta$  eine ca. 40fache Aktivitätssteigerung (Barksdale et al. 2004). An primären Alveolar-makrophagen und an primären Atemwegsfibroblasten der Ratte bleibt die synergistische Wirkung der Kombination des TGF- $\beta$  mit IL-4 oder mit IL-13 jedoch aus. Das Aktivitätsniveau der beiden betrachteten Enzyme Arginase und iNOS wird zwar durch die einzeln eingesetzten Interleukine signifikant beeinflusst, eine weiterführende Aktivitätssteigerung im Falle der Arginase bzw. eine stärkere Hemmwirkung auf die iNOS-Aktivität wird durch Kombination mit TGF- $\beta$  jedoch nicht erreicht.

Im Gegensatz hierzu erweist sich die Kombination des TGF- $\beta$  mit dem bekannten Arginase- und iNOS-Induktor LPS als hoch wirksam. Die geringe Effektivität des TGF- $\beta$ , die Arginase in ihrer Aktivität zu steigern, wird durch Inkubation der Alveolar-makrophagen bei gleichzeitiger Anwesenheit von LPS stark gesteigert, und zwar in einem Ausmaß, das über eine Addition der Effekte hinausgeht. Gleichzeitig kommt es zu einer teilweisen Antagonisierung der LPS-induzierten Steigerung der iNOS-Aktivität. Dies wird besonders bei steigenden LPS-Konzentrationen sowohl auf Aktivitätsebene im Enzymassay deutlich als auch bei der Betrachtung der mRNA-Expression für Arginase I und iNOS. Bereits exprimierte mRNA für Arginase II wird durch LPS stabilisiert bzw. in ihrem Abbau verlangsamt (Klasen et al. 2001); ein Effekt, der durch TGF- $\beta$  nicht beeinflusst wird. Die nähere Bedeutung einer Arginaseinduktion durch LPS wurde bereits in vorangegangenen Studien ausführlich demonstriert (Klasen et al. 2001). Der Synergismus mit TGF- $\beta$  unterstreicht darüber hinaus dessen komplexe Rolle im Entzündungsgeschehen.

Die bisher dargestellten Ergebnisse belegen unter Berücksichtigung der zitierten Untersuchungen insgesamt eine große Variabilität in der Expression der Arginase-

Isoenzyme und der iNOS sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter proinflammatorischen Umständen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Lokalisation und das betrachtete Zellsystem. Hinzu kommen Spezies- und Organsystem-spezifische Unterschiede sowie Divergenzen zwischen Zelllinien und Primärzellen. Die Variabilität äußert sich sowohl im Ausgangsniveau als auch in der Induzierbarkeit des jeweils betrachteten Enzymsystems. In den Atemwegs-fibroblasten konnten sowohl Arginase als auch iNOS zu keiner Zeit und mit keinem Kostimulus durch TGF- $\beta$  reguliert werden. Hingegen unterlagen beide Enzymsysteme in den primären Alveolarmakrophagen nach der immunologischen Aktivierung mit LPS einer intensiven Regulation durch TGF- $\beta$ . Ein enger Zusammenhang zwischen der Regulation der Arginase-Isoenzyme und den in der Einleitung beschriebenen möglichen Funktionen, die beispielsweise in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation diskutiert werden, erscheinen vor dem Hintergrund der geschilderten Ergebnisse wahrscheinlich.

### **1.3 Mechanismen der Koaktivität von TGF- $\beta$ und LPS**

Obgleich die Kombination von TGF- $\beta$  mit LPS synergistische Effekte auf die Arginaseexpression in primären Alveolarmakrophagen ausübt, bleibt eine Beeinflussung der IL-4- und IL-13-induzierten Aktivitätssteigerung durch TGF- $\beta$  jedoch aus. Dieses Ergebnis weist auf verschiedene Mechanismen hin, über die die Aktivitätssteigerung hervorgerufen wird. In der Tat wurde, wie in der Einleitung bereits dargelegt, für die positive Regulation der Arginase I durch IL-4 oder IL-13 die Beteiligung des JAK/STAT- sowie des cAMP/PKA-Signalwegs beschrieben (Wei et al. 2000). Hingegen wurde für die LPS-vermittelte Induktion sowohl der Arginase I als auch der iNOS in den Alveolarmakrophagen der Ratte NF $\kappa$ B als essentieller, wenn auch nicht hinreichender Transkriptionsfaktor charakterisiert (Hammermann et al. 2000a; Klasen et al. 2001).

LPS führt zu einer *Toll like receptor 4* (TLR 4) -abhängigen oder -unabhängigen Aktivierung des NF $\kappa$ B, das im Zytosol durch Komplexierung mit I $\kappa$ B inaktiv vorliegt. Diese inhibitorische Untereinheit maskiert die Translokationssequenz wie auch die DNA-Bindedomäne des Proteins. Aktivierung des TLR 4 initialisiert die I $\kappa$ B-Kinase

(IKK) zur Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B mit anschließender Ubiquitinierung und Proteasom-vermittelter Degradation. Der nun frei vorliegende Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, bestehend aus den Untereinheiten p50/p65, diffundiert in den Kern und steht für die Bindung an seine Konsensussequenz des entsprechenden Targetgens aktiv zur Verfügung (Li und Stark 2002). NF $\kappa$ B vermittelt auf diesem Wege als zentraler Mobilisator Immunantworten, Reaktionen unter Stressbedingungen und Anpassung von Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen an aktuelle Gegebenheiten.

Signaltransduktion durch TGF- $\beta$  läuft nach Aktivierung membranständiger Rezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität über intrazelluläre Smad-Proteine ab. Nach der Bindung des Liganden bilden TGF- $\beta$ -Rezeptor-Typ 1 und -Typ 2 ein Heterodimer. Dies ermöglicht dem Typ 2-Rezeptor die Kinasedomäne des Typ 1-Rezeptors zu phosphorylieren, der nun seinerseits das Signal durch Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Mitglieder der Smad-Familie (r-Smads), Smad 2 und Smad 3, weiterleitet. Nach anschließender Komplexbildung mit Smad 4 (co-Smad) erfolgt die Translokation in den Zellkern. Um eine eindeutige Transkriptionsantwort auszulösen, sind Smads auf Grund ihrer geringen Spezifität bezüglich ihrer DNA-Bindung auf die Kooperation untereinander oder mit weiteren DNA-Bindeproteinen angewiesen (Shi und Massague 2003). Aktivierung von Transkriptionsvorgängen durch r-Smads basiert auf physikalischen Interaktionen und funktionellen Kooperationen mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren und den essentiellen Koaktivatoren p300 und *CREB-binding-protein* (CBP; Derynck und Zhang 2003).

p300 und CBP besitzen Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität, was nahe legt, dass ihre Rekrutierung in einen Smadkomplex die Transkription des Targetgens durch Modifikation der Nukleosomenanordnung, also durch Öffnung der Chromatinstruktur im Promotorbereich, erhöht (Massague und Wotton 2000). Generell führt die posttranskriptionelle Modifikation der Acetylierung von Histonproteinen zu einer „Entwindung“ der DNA vom DNA-Histon-Komplex und erlaubt somit Transkriptionsfaktoren und Enzymen zu binden und die Gentranskription anzustoßen. Histon-deacetylierung ist im Allgemeinen mit der Unterdrückung der Transkription assoziiert.

Interessanterweise stimuliert LPS die Histonacetylierung im MAP-Kinase-Phosphatase-M (mkp-M)-Promotor von RAW 264.7 und initiiert auf diese Weise die Transkription (Musikacharoen et al. 2003). Des Weiteren hebt eine Studie von Deng *et al.* aus dem Jahr 2004 die Fähigkeit des LPS hervor, die Bindung von p300 an den Cyclooxygenase 2 (COX)-Promotor von RAW 264.7 zu verstärken. Die Schlüsselrolle des p300 in der Gentranskription stellt dessen Bindung an verschiedene Transkriptionsaktivatoren dar, die ihrerseits an spezifische regulatorische Promotorelemente binden. Der Grad der Bindung zwischen p300 bzw. *p300/CBP-associated factor* (PCAF) wird am COX 2-Promotor durch LPS reguliert (Deng et al. 2004).

Um sich der Frage zu nähern, ob sich die beschriebenen Beobachtungen am COX 2-Promotor auf die Verhältnisse am Arginasepromotor übertragen lassen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Substanz Anacardic Acid auf die Aktivität und Expression der Arginase in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$  und LPS ermittelt. Bei Anacardic Acid handelt es sich um einen potenten, nichtkompetitiven HAT-Inhibitor mit besonderer Aktivität gegenüber p300 und PCAF (Balasubramanyam et al. 2003). Ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M vermag Anacardic Acid die Vermittlung des TGF- $\beta$ -Effekts durch LPS sowohl auf die Aktivität der Arginase also auch auf die Transkription der Arginase-mRNA signifikant zu verhindern.

Letztendlich kann dieser Befund als Hinweis auf eine Beteiligung der Histonacetylierung an der Regulierung der LPS- und TGF- $\beta$ -vermittelten Effekte am Arginasepromotor bzw. in der Folge an der Regulierung von Transkription und Enzymaktivität der Arginase dienen. Etwa 1700 bp vor dem Transkriptionsstart liegt im Promotorbereich der Arginase I eine Smad-Bindungsstelle (SBE). Da diese Bindungsstellen auf Grund ihrer Kürze (minimum 4 bp) in nahezu jeder regulatorischen Region des Genoms zu finden sind, sind sie in der Regel gut maskiert. Um eine spezifische Regulierung zu gewährleisten, ist meist eine Öffnung der Chromatinstruktur unter der Beteiligung oben genannter Koaktivatoren notwendig. LPS könnte also die Rekrutierung der Kofaktoren p300 und PCAF, wie am Beispiel des COX 2-Promotors gezeigt, verstärken. Gleichzeitig aktiviert TGF- $\beta$  die Smad-Signalkaskade, die jedoch für sich genommen keine hinreichende Promotoraktivierung erzeugt. Durch LPS rekrutiertes p300 öffnet den Promotor im Bereich der SBE, komplexiert

---

den Smadkomplex und ermöglicht so dessen Bindung an das entsprechende DNA-Element und in der Folge die Aktivierung des Arginasepromotors.

In jedem Versuchsansatz wurde aus Vergleichsgründen neben der Arginaseaktivität oder -expression jeweils auch die Nitritakkumulation bzw. die iNOS-Expression analysiert. TGF- $\beta$  bewirkt in diesem Fall eine Abschwächung der LPS-induzierten Steigerung der iNOS-Expression. Diese korreliert mit der Reduktion der LPS-induzierten Nitritakkumulation durch TGF- $\beta$ . Der Effekt lässt sich durch extrem starke interindividuelle Schwankungen der einzelnen Zellpräparationen bereits im Ausgangsniveau dieser Versuchsreihe statistisch nicht quantifizieren, scheint aber, wie auch schon bei der Betrachtung des Effekts auf das Ausgangsniveau, ausgeprägter zu sein im Vergleich zum Effekt auf die Expression der Arginase I und der Arginaseaktivität.

LPS-induzierte iNOS-Aktivität und -Expression in Alveolarmakrophagen wird also im Gegensatz zur Arginase durch TGF- $\beta$  reduziert. Dieses Ergebnis wurde bereits für RAW 264.7 beschrieben und war somit zu erwarten (Gilbert und Herschman 1993; Werner et al. 2000). Hingegen wird von Fibroblasten Gegenteiliges berichtet (Kleinert et al. 1996). Der dahinterstehende Mechanismus wird jedoch kontrovers diskutiert. Außer Frage steht dabei die Beteiligung des durch LPS aktivierten Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Ob jedoch die Stabilisierung der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B durch TGF- $\beta$  (Li und Stark 2002) eine Verringerung der Stabilität von mRNA und Protein bzw. gesteigerter Abbau der iNOS (Vodovotz et al. 1993; Dai et al. 2003) oder doch eine Konkurrenz zwischen NF $\kappa$ B und Smad 3 um Koaktivatoren (DiChiara et al. 2000; Werner et al. 2000) im Vordergrund steht, bleibt zu diskutieren. Umgekehrt wird auch NF $\kappa$ B als Inhibitor TGF- $\beta$ -vermittelter Effekte beschrieben (Bitzer et al. 2000).

Die beobachteten gegensätzlichen Befunde an einer Zellart, also die Signalverstärkung im Falle der Arginase und die Repression bezüglich der iNOS, zeigen die Komplexität TGF- $\beta$ - bzw. Smad-vermittelter Effekte auf, die in höchstem Maße vom Kontext abhängig sind. So einfach die TGF- $\beta$ -Rezeptor-vermittelte Signalkaskade auf den ersten Blick auch erscheint, so vielschichtig gestalten sich ihre Regulationsmöglichkeiten. Mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau kann durch

Testsubstanzen mit Einfluss auf die Aktivität von Histondeacetylasen (HDACs) der LPS-vermittelte TGF- $\beta$ -Effekt auf die Arginaseaktivität nicht beeinflusst werden. Weder vermag Trichostatin A (TSA), ein häufig verwendeter HDAC-Inhibitor, den Effekt zu fördern, noch ist Theophyllin, ein bekannter HDAC-Aktivator, in der Lage, den beobachteten Effekt zu antagonisieren. Der Einsatz von Trichostatin A führt sogar konzentrationsabhängig zum gegensätzlichen Ergebnis, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die zytotoxischen Eigenschaften der Substanz im Vordergrund stehen. Aufgrund dessen scheint dieses pharmakologische Werkzeug für eine detaillierte Detektion der geschilderten Vorgänge ungeeignet. Theophyllin wurde besonders im Zusammenhang mit proinflammatorischer Genexpression als potenter HDAC-Induktor beschrieben, der der Transkriptionsaktivierung entgegen wirkt (Ito et al. 2002). Allerdings ist anzunehmen, wie auch im Falle des TSA, dass ein derartig generalisiertes Signal korrespondierende Transkriptionsvorgänge mit beeinflusst und demzufolge eine unerkannte parallele Regulation abläuft. Somit muss überprüft werden, ob der gewählte Versuchsaufbau und das Detektionsprinzip in seiner Präzision hoch genug sind, um derart komplexe Regulationen abzubilden, oder ob weitere Mechanismen die oben beschriebene Regulation möglicherweise überlagern.

## 2 Funktionelle Bedeutung der Arginase in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte

Neben der Beeinträchtigung des NO-Stoffwechsels und damit einhergehender reduzierter Bronchodilatation und erhöhter Entzündungsreaktion, scheint ein gesteigerter Argininmetabolismus in den Atemwegen über Arginase im chronischen asthmatischen Stoffwechselgeschehen über NO-unabhängige Signalwege durch erhöhte Ornithinproduktion zum Remodeling der Atemwege beizutragen. In dieser Beziehung wird über die Bereitstellung des Vorläufermoleküls *L*-Ornithin durch die Arginase die Produktion der nachgeschalteten Produkte *L*-Prolin und Polyamine sichergestellt.

### 2.1 Arginase und Proliferation

Die potenzielle Rolle der Arginase in der Atemwegsfibrose bei *Asthma bronchiale* wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass die in asthmatischen Prozessen bedeutsamen Th<sub>2</sub>-Interleukine IL-4 und IL-13 in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte eine Steigerung der Arginase I- und II-Expression bzw. der Arginaseaktivität auslösen (Lindemann und Racké 2003). Einen weiteren Hinweis liefern die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, die in der Tat die erwartete proliferationssteigernde Wirkung der Th<sub>2</sub>-Interleukine IL-4 und IL-13 auf Atemwegsfibroblasten der Ratte statistisch signifikant belegen. Somit scheint zwischen Aktivitätsstatus der Arginase und Proliferationsverhalten der Fibroblasten eine Verbindung zu bestehen.

Um dieser Hypothese zu folgen und die Bedeutung des Arginase-Ornithin-Polyamin-Weges in der proproliferativen Antwort der Fibroblasten auf den Interleukinstimulus näher zu beleuchten, wurde durch Kombinationsversuche mit  $\alpha$ -Difluoromethylornithin (DFMO) zunächst getestet, ob die beobachtete Proliferationssteigerung auf eine erhöhte Polyaminsynthese über *L*-Ornithin zurückzuführen ist. DFMO ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor der Ornithindecaboxylase (ODC), des Enzyms, welches die Umsatzreaktion des *L*-Ornithins zu Putrescin katalysiert. Im Ergebnis wirkt die Blockade der Polyaminsynthese über ODC der Proliferationssteigerung

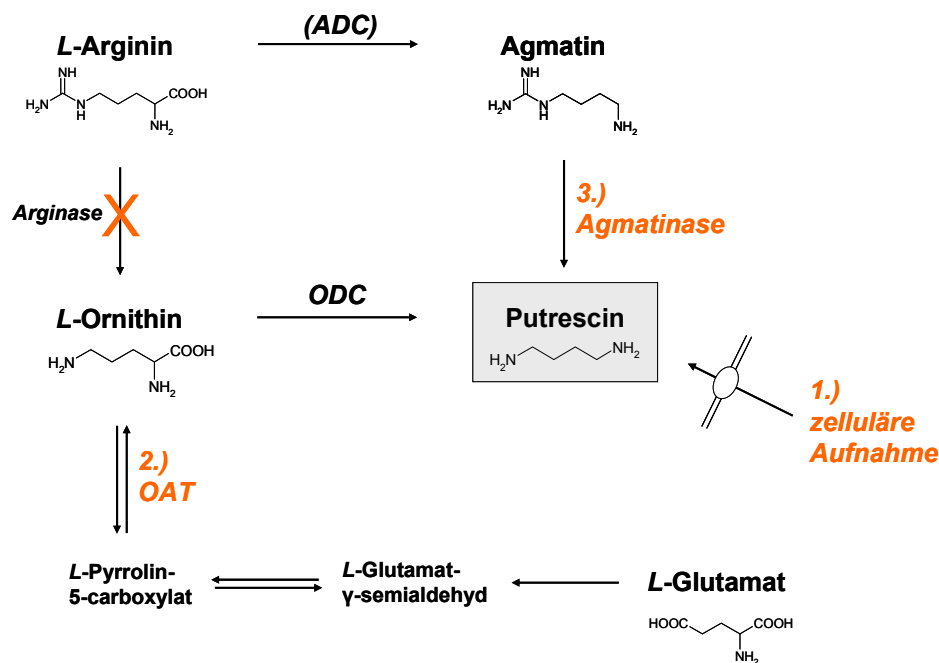
durch IL-4 oder IL-13 entgegen. Demzufolge wird auf diese Weise der limitierende Effekt der Polyaminverfügbarkeit auf die Proliferation demonstriert. Demnach stellt sich im Umkehrschluss die Frage, ob die IL-4- bzw. IL-13-induzierte Proliferationssteigerung aus einer gesteigerten Transkription der ODC gefolgt von intensivierter Polyaminsynthese resultiert. Diesen Überlegungen widersprechen jedoch die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse. Inkubation der Atemwegsfibroblasten mit IL-4 in Zeitintervallen zwischen 15 min und 2 h ruft keine Expressionsänderung der ODC hervor.

Arginaseinhibition durch norNOHA oder BEC, beides kompetitiv wirkende Arginaseinhibitoren, hat im Gegensatz zum DFMO-Effekt keine Proliferationshemmung zur Folge. Weder die basale Proliferationsrate noch das durch IL-4 oder IL-13 gesteigerte Proliferationsniveau wird durch Inkubation in Anwesenheit von und nach Vorinkubation mit Arginaseinhibitoren beeinflusst. Hieraus lässt sich schließen, dass Arginase keinen limitierenden Faktor bezüglich der Verfügbarkeit der Polyamine darstellt. Folglich kann an den betrachteten Atemwegsfibroblasten der Ratte eine determinierende Rolle der Arginase auf proliferative Prozesse nicht bestätigt werden, entgegen der breit vertretenen Meinung in der Literatur, die jedoch in der Mehrzahl aus Ergebnissen an arginasetransfizierten Zellen resultiert (Kepka-Lenhart et al. 2000; Wei et al. 2001; Li et al. 2001). Daher scheint die Hypothese, dass IL-4- und IL-13-vermittelte Proliferationssteigerung von Atemwegsfibroblasten aus erhöhter Arginaseaktivität und daraus resultierender Steigerung der Ornithinverfügbarkeit für die Polyaminsynthese resultiert, widerlegt zu sein. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden von Deignan *et al.* an *Arginase-single-* und *-double-knock-out* Mäusen, nach denen weder Arginase I noch Arginase II zur Aufrechterhaltung der *L*-Ornithin- oder Polyaminlevel in den untersuchten Geweben essentiell schienen (Deignan et al. 2007). Ferner führte die Überexpression der Arginase in RAW 264.7 nicht zu erhöhten Proliferationsraten, obgleich eine Limitierung der Polyaminsynthese durch die Arginase in dieser Studie beobachtet werden konnte (Kepka-Lenhart et al. 2000).

Infolgedessen scheinen die primären Atemwegsfibroblasten der Ratte über ausreichende Kompensationsmechanismen zu verfügen, wenn der Biosyntheseweg über die Arginase blockiert ist. Dazu kommen grundsätzlich mehrere Mechanismen



in Betracht, die sicherlich in verschiedenen Zellsystemen in unterschiedlicher Ausprägung zu finden sind. An erster Stelle wäre die Substitution durch gesteigerte zelluläre Aufnahme zu nennen, gefolgt von der kompensatorischen Biosynthese aus Glutamat oder alternativ über das Zwischenprodukt Agmatin (siehe *Abb. 25*). Eine weitere Möglichkeit beschreibt die Verstoffwechslung des *L*-Arginins zu Kreatin über das Enzym Arginin:Glycin Aminotransferase (AGAT, siehe *Abb. 1*), bei der als Nebenprodukt *L*-Ornithin anfällt (Deignan et al. 2007), oder die Polyaminsynthese aus *L*-Prolin im Darm Cortisol-behandelter Ferkel (Wu et al. 2000).



**Abb. 25:** Alternative Polyaminbiosynthese nach Blockade der Arginase

OAT Ornithinaminotransferase

ODC Ornithindecarboxylase

ADC Arginindecarboxylase

1.) Gestörte *de novo* Polyaminsynthese kann prinzipiell durch Polyaminaufnahme aus der zellulären Umgebung über ein aktives Transportsystem substituiert werden. Zellen mit hohem Bedarf, wie beispielsweise Fibroblasten, die einen proliferativen Stimulus erfahren haben (Pohjanpelto 1976), oder generell schnell proliferierende Zellen, zeichnen sich durch erhöhten Polyamintransport aus. Ebenso steigt die Polyaminaufnahme bei Verarmung an intrazellulären Polyaminen um ein Vielfaches

an. Zelluläre Polyaminlevel werden auf verschiedensten Ebenen reguliert, wie z.B. auf Synthese-, Degradations-, Uptake- und Efflux-Level (Thomas und Thomas 2001). Somit können die Zellen die intrazelluläre Polyaminkonzentration an physiologische Erfordernisse und pathophysiologische Situationen durch Aufnahme und Freisetzung schnell und gezielt anpassen (Seiler und Dezeure 1990).

2.) Das Enzym Ornithinaminotransferase (OAT) katalysiert im Rahmen der Arginin-Glutamat-Homöostase die gegenseitige Umwandlung von *L*-Ornithin in Glutamatsemialdehyd. Die Lage des Reaktionsgleichgewichts ist abhängig vom Organsystem und wird gewebespezifisch fein reguliert (Ventura et al. 2008). Der Metabolisierungsschritt befindet sich genau an der Gabelung zweier wichtiger Stoffwechselwege: Arginin- und Polyaminmetabolismus einerseits und Glutamat- und Prolinmetabolismus auf der anderen Seite. Da die OAT der einzige Link zwischen *L*-Arginin und *L*-Glutamat ist, könnte sie in der Regulation der Bioverfügbarkeit des *L*-Ornithins eine wichtige Rolle einnehmen und dementsprechend eine defiziente Ornithinbereitstellung nach Arginaseinhibition kompensieren.

3.) Im Rahmen des Argininkatabolismus konvertiert die Arginindecarboxylase (ADC) *L*-Arginin zu Agmatin. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Identifizierung dieses Enzyms in Säugerzellen allerdings umstritten (Mistry et al. 2002; Coleman et al. 2004). Dennoch ist Agmatin Bestandteil zahlreicher Säugerzellen. Intrazelluläre Agmatinkonzentrationen variieren jedoch stark zwischen verschiedenen Organen. Agmatin selbst inhibiert Proliferationsprozesse durch Suppression intrazellulärer Polyaminlevel (Isome et al. 2007). Humane Agmatinase, das Enzym, welches Agmatin in Putrescin überführt, wurde von Iyer *et al.* identifiziert und geklont und sowohl strukturelle als auch funktionelle Homologien zur humanen Arginase beschrieben (Iyer et al. 2002). Somit steht prinzipiell eine ODC-unabhängige Putrescin-Biosynthese zur Verfügung, aber praktisch existieren keine Daten bezüglich der quantitativen Signifikanz dieses alternativen Stoffwechselweges (Morris, Jr. 2006).

Die dargestellten Ergebnisse und Betrachtungen lassen den Schluss zu, dass die Ornithinverfügbarkeit zwar entscheidend ist für die proliferative Antwort der Fibroblasten nach IL-4- bzw. IL-13-Inkubation, aber dessen Bereitstellung nicht

ausschließlich durch die Arginase limitiert wird. Die Arginase ist also nicht alleinverantwortlicher Regulator der Substratverfügbarkeit für die Ornithindecaboxylase und somit der Putrescinsynthese. Zelluläre Putrescinaufnahme und Synthese über Agmatin sind allerdings unter den gewählten Bedingungen auch nicht in der Lage, die reduzierte Polyaminsynthese nach ODC-Hemmung zu kompensieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen oder sogar wahrscheinlich, dass der Putrescingehalt des Mediums, der unter diesen Bedingungen bei 0,081 mg/ml lag, nicht ausreicht, um eine Kompensation durch eine gesteigerte Transportkapazität zu gewährleisten, und dass die Fibroblasten nicht über die notwendige Enzymausstattung zur Agmatinsynthese verfügen oder keine Agmatinase exprimieren.

Demnach erscheint die ODC-vermittelte Reaktion als bedeutsamster Syntheseschritt der Polyaminbereitstellung und *L*-Ornithin somit als essentielles Intermediat. Diese Aussage deckt sich mit zahlreichen Berichten, die die ODC als wichtigstes und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym in der Kontrolle der Polyaminsynthese beschreiben, das sich auszeichnet durch sensitive Regulation auf den Ebenen der Transkription und Translation, aber auch durch post-translationelle Modifikationen und eine kurze Halbwertszeit (Shantz und Pegg 1999).

## **2.2 Arginase und Kollagensynthese**

Da durch Arginase produziertes *L*-Ornithin neben dessen Verstoffwechslung zu Putrescin ebenso als Vorläufer zur Prolinsynthese dienen kann, welches seinerseits das Ausgangsmaterial für die Produktion des prolinreichen Proteins Kollagen darstellt, besteht auch in dieser Hinsicht Interesse an der Rolle der Arginase in Remodelingvorgängen. Denn, wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde, stellt Kollagen sowohl quantitativ als auch qualitativ eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix (ECM) dar. Den größten Beitrag zur Synthese leisten hierbei Fibroblasten durch Sekretion verschiedener Bestandteile der ECM, darunter insbesondere auch des Kollagens (Kotaru et al. 2006).

Ein allgemein anerkannter und häufig verwendeter positiver Stimulus zur Kollagensynthese stellt TGF- $\beta$  dar. Und wie erwartet reagieren die primären Atemwegsfibroblasten der Ratte mit einer signifikant gesteigerten Kollagen 1-

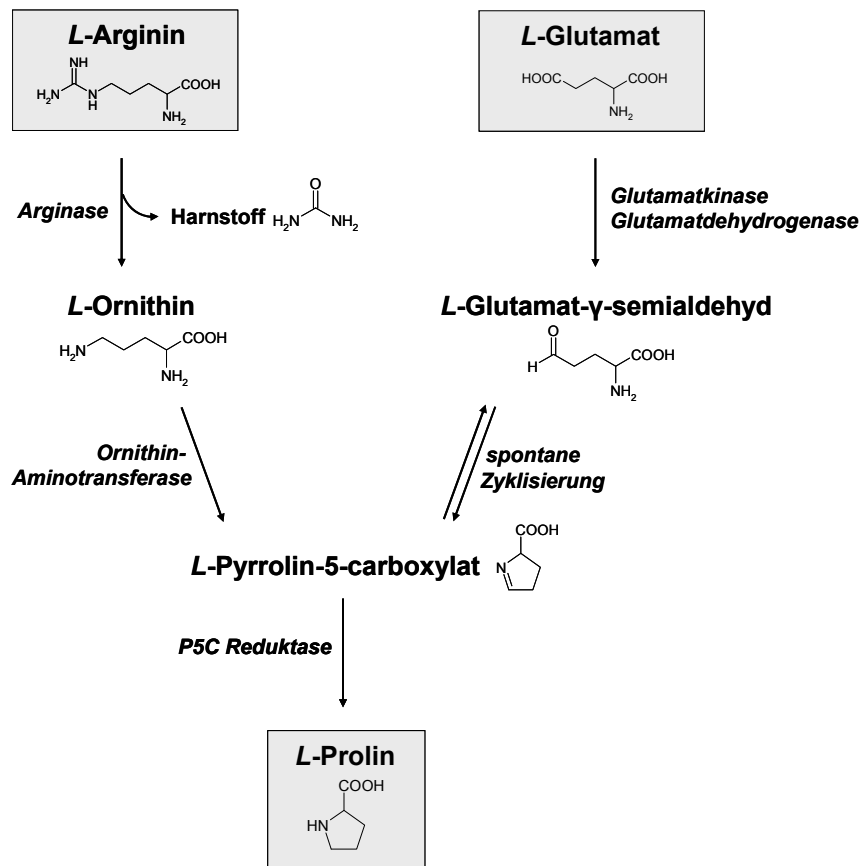
Sekretion ins Zellkulturmedium. Der spezifische Arginaseinhibitor norNOHA erwirkt bereits nach 48 h in diesem Zellsystem eine hochsignifikante Senkung der Kollagen 1-Akkumulation im Vergleich zum Kontrollniveau. Gleichfalls wird in Anwesenheit von norNOHA durch TGF- $\beta$  keine verstärkte Sekretion mehr hervorgerufen. Der positive Stimulus führt also nicht mehr zur erhöhten Syntheseleistung.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Funktion der Arginase in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte als Substratlieferant für die Kollagensynthese. Gleichzeitig bestätigen sie vorangegangene Befunde an dermalen Fibroblasten der Ratte aus Wundgewebe (Witte et al. 2002) und an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte (Durante et al. 2001), die ebenfalls der Arginase eine limitierende Funktion auf die Bereitstellung der Aminosäure *L*-Prolin und somit auf das Ausmaß der Kollagensynthese zusprechen. Und auch am Tiermodell der Leberzirrhose wurde ersichtlich, dass der verfügbare Prolinpool das Ausmaß der Kollagensyntheserate unter Bedingungen, die eine schnelle Kollagensynthese erfordern, limitiert (Albina et al. 1993). In diesem Zusammenhang wurde auch erwähnt, dass die mögliche alternative Prolinsynthese, ausgehend von Glutamat, keine quantitativ bedeutsame Rolle zu spielen scheint. Hierdurch wird wiederum der Stellenwert, den die Bereitstellung des *L*-Prolins zur Kollagensynthese durch die Arginase einnimmt, erhöht.

### **2.3 Speziesabhängige Unterschiede**

Bei der Interpretation der soeben beschriebenen Ergebnisse können die in unserer Arbeitsgruppe parallel erlangten Befunden an primären humanen Atemwegsfibroblasten, die allerdings kein Bestandteil dieser Arbeit sind, nicht außer Acht gelassen werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen an Rattenfibroblasten beeinflussen sowohl norNOHA als auch BEC die Kollagensynthese an humanen Fibroblasten nicht. TGF- $\beta$  weist die gleiche Wirksamkeit bezüglich der Kollagensekretion auf, wie es schon an den Rattenfibroblasten beschrieben wurde. Es kommt nach 48 h zu einer signifikant gesteigerten Kollagenakkumulation im Zellkulturüberstand. Aber auch dieses durch TGF- $\beta$  erhöhte Ausgangsniveau bleibt durch Koinkubation mit norNOHA oder BEC unverändert. Somit scheint die über diesen Weg reduzierte Prolinsynthese durch alternative Quellen kompensiert zu werden.

Eine parallele Synthese könnte, wie in *Abbildung 26* dargestellt, über die Aminosäure *L*-Glutamat als Ausgangsmolekül stattfinden.



**Abb. 26:** Arginase-abhängige und Arginase-unabhängige Prolinbiosynthese

Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *L*-Glutamat in diesen Zellen die Hauptquelle der Prolinbiosynthese darstellt. Denn werden die Fibroblasten beider Spezies nicht nur bezüglich der Funktion, sondern auch mit Blick auf das Aktivitätsniveau der Arginase verglichen, so zeigen sich beträchtliche Unterschiede. In humanen Atemwegsfibroblasten liegt die Aktivität knapp unterhalb der Detektionsgrenze ca. 10fach niedriger als in primären Atemwegsfibroblasten der Ratte. Diese Ergebnisse korrelieren mit den erheblichen Unterschieden im Expressionsmuster der Arginaseisoenzyme. Wie bereits zu Beginn dieser Diskussion beschrieben, exprimieren Rattenfibroblasten zwar mRNA für beide Isoenzyme, jedoch mit Arginase I als scheinbar überlegener Isoform. Hingegen scheinen humane Lungen-

fibroblasten ausschließlich Arginase II zu exprimieren, da das Transkript für Arginase I in der Expressionsanalyse über PCR auch nach 40 Amplifikationszyklen nicht nachweisbar war.

Die vorliegenden Befunde unterstreichen einen Zusammenhang zwischen den beschriebenen möglichen Funktionen der Arginase-Isoenzyme in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation. Da nur in Rattenfibroblasten sowohl Arginaseaktivität detektierbar ist als auch Arginase I exprimiert wird, und dies mit der Beeinflussung der Kollagensynthese durch Arginaseinhibition korreliert, scheint nur das zytosolische Isoenzym ausreichend *L*-Ornithin zur Verfügung zu stellen, um den Prolinbedarf zur Kollagensynthese zu decken.

Im Vergleich beider Spezies wird bereits die Meinung vertreten, dass Nagerzellen wesentlich empfindlicher auf entsprechende Stimuli mit Steigerung der iNOS-Expression reagiert (Beck et al. 1999). Außerdem liegen aus dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten an Alveolarmakrophagen Hinweise vor, dass das NOS-System in Rattenzellen wesentlich leichter ansprechbar ist als beispielsweise in Kaninchen (Hey et al. 1995). Somit wäre eine leichter induzierbare Arginaseaktivität in dieser Spezies ein wirkungsvoller Kontroll- und Gegenregulationsmechanismus mit allen metabolischen Konsequenzen.

In diese Richtung weisen auch die Befunde der Studie von Munder *et al.* bezüglich Arginase-Expression in Immunzellen. In murinen Immunzellen kann Arginase I durch Th<sub>2</sub>-Interleukine leicht induziert werden, wobei im humanen System nur Granulozyten eine konstitutive aber durch Th<sub>2</sub>-Zytokine nicht regulierbare Arginase I-Expression aufweisen (Munder et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse lieferten aktuelle Analysen unserer Arbeitsgruppe an Alveolarmakrophagen hinsichtlich des basalen Expressionsniveaus der Arginase-Isoenzyme. Primäre Alveolarmakrophagen der Ratte weisen, wie im Laufe dieser Arbeit bereits mehrfach beschrieben, eine starke basale Arginase I-Expression auf und deutlich detektierbare aber wesentlich geringere Arginase II-Expression. Hingegen ist eine basale Arginase I-Expression in primären humanen Alveolarmakrophagen aus Bronchoalveolarlavagen nach 30 Amplifikationszyklen kaum detektierbar, wohingegen das Grundniveau der Arginase II-Expression deutlich über dem der Alveolarmakrophagen der Ratte liegt (Warnken et al. 2007), hier also wie auch in den Fibroblasten die Arginase II die bedeutendere Isoform zu sein scheint.

Abschließend lässt sich sagen, dass Erkenntnisse über den *L*-Arginin-Arginase-iNOS-Stoffwechsel aus Tiermodellen über die Pathogenese entzündlicher und obstruktiver Atemwegserkrankungen, besonders vor dem Hintergrund des therapeutischen Einsatzes von Arginaseinhibitoren, z.B. bei *Asthma bronchiale* (Maarsingh et al. 2008), bei der Übertragung auf humane Modelle immer unter der besonderen Berücksichtigung von Speziesdifferenzen betrachtet werden müssen.





## F Zusammenfassung

Im Blickpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Bedeutung einer vermehrten Verstoffwechselung der Aminosäure *L*-Arginin durch das Enzym Arginase zu den beiden Produkten *L*-Ornithin und Harnstoff vor dem Hintergrund einer gesteigerten Aktivität dieses Enzyms während entzündlicher und fibrotischer Prozesse im Asthmageschehen. Die Arginase, besonders die Isoform Arginase I, ist klassischerweise ein Enzym des Harnstoffzyklus, der seine Bedeutung in der Entgiftung von Ammoniak in der Leber findet. In zahlreichen extrahepatischen Zellen und Geweben steht jedoch die Bereitstellung des *L*-Ornithins im Vordergrund, welches das zentrale Ausgangsprodukt zur Synthese von *L*-Prolin, und nachfolgend von Kollagen, und zur Synthese von Polyaminen als Regulatoren von Proliferationsprozessen darstellt. Des Weiteren steht die Arginase in Konkurrenz mit der induzierbaren NO-Synthase um das gemeinsame Substrat *L*-Arginin. Da in bestimmten pathophysiologischen Situationen, zu denen neben Wundheilung bzw. chronischen entzündlichen Bedingungen auch das Krankheitsbild des *Asthma bronchiale* zählt, ein verändertes Expressionsmuster der Arginase beobachtet wurde, stellte sich die Frage nach der regulatorischen und der funktionellen Bedeutung der Arginase in Stoffwechselfvorgängen, die an der Steuerung von Zellwachstum, Bereitstellung von extrazellulären Matrixproteinen und NO-Synthese beteiligt sind.

Die gesteigerte TGF- $\beta$ -Expression in den Atemwegen von Asthmapatienten bot Anlass zu der Frage, ob Arginaseaktivität durch TGF- $\beta$  reguliert werden kann. Die in dieser Arbeit betrachteten Zellsysteme, primäre Alveolarmakrophagen und Atemwegsfibroblasten der Ratte, exprimierten sowohl iNOS als auch Arginase I und Arginase II, Arginase I jedoch in wesentlich höherem Ausmaß. Insgesamt lag das Expressionsniveau in den Alveolarmakrophagen entsprechend ihrer Funktion deutlich höher als in den Fibroblasten. TGF- $\beta$  beeinflusste die Aktivität und Expression der Arginase in diesen Zellen nicht direkt, jedoch konnte an den Alveolarmakrophagen in Anwesenheit proinflammatorischer Stimuli, wie beispielsweise bakterielle Lipopolysaccharide, eine massive Steigerung des TGF- $\beta$ -Effekts beobachtet werden. Hingegen übte TGF- $\beta$  bereits im niedrigen Konzentrations-

bereich einen signifikanten Hemmeffekt auf Aktivität und Expression der induzierbare NO-Synthase aus.

Die nähere Analyse der kombinatorischen Wirksamkeit von TGF- $\beta$  und LPS auf die Aktivität und Expression der Arginase I mit verschiedenen Substanzen, die einen Einfluss auf den Acetylierungsstatus von Histonproteinen ausüben, legte die Vermutung nahe, dass Acetylierungsprozesse an DNA-assoziierten Histonproteinen für das Wirksamwerden des TGF- $\beta$  auf Transkriptionsebene in Anwesenheit von LPS verantwortlich sind.

Funktionelle Betrachtungen ergaben, dass die Arginase kein limitierender Faktor für die Bereitstellung des *L*-Ornithins zur Polyaminsynthese in primären Atemwegs-fibroblasten der Ratte ist. Arginaseinhibition führte zu keiner Beeinträchtigung der proliferativen Aktivität der Fibroblasten, weder der Basisrate noch nach erfolgter Stimulation durch die Th<sub>2</sub>-Zytokine IL-4 oder IL-13. Anders sah es auf Ebene der Kollagensynthese aus. Durch Einsatz von Arginaseinhibitoren wurde die Sekretion des Kollagen 1 sowohl im Vergleich zum Kontrollniveau als auch nach Stimulation durch TGF- $\beta$  deutlich gesenkt.

Allerdings verdeutlichen parallel erlangte Befunde an primären humanen Lungenfibroblasten, dass Arginaseisoenzyme speziesabhängige Expressionsmuster aufweisen, die auf funktioneller Ebene zu Konsequenzen führen. Arginase scheint signifikant zur Prolinbereitstellung in Atemwegsfibroblasten der Ratte beizutragen, in denen Arginase I das dominierende Isoenzym darstellt, nicht jedoch in primären humanen Lungenfibroblasten, in denen Arginase II als einziges Isoenzym exprimiert wird.

Diese Speziesdifferenzen müssen berücksichtigt werden, wenn in Tierversuchen die Wertigkeit von Arginaseinhibitoren als mögliche Arzneistoffklasse zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise *Asthma bronchiale* (Maarsingh et al. 2008), geprüft wird.

## G Literatur

- Albina JE, Mills CD, Henry WL, Jr., and Caldwell MD (1990) Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* 144: 3877-3880
- Albina JE, Abate JA, and Mastrofrancesco B (1993) Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *J Surg Res* 55: 97-102
- Ash DE (2004) Structure and function of arginases. *J Nutr* 134: 2760S-2764S
- Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, and Moncada S (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108: 833-837
- Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, and Kundu TK (2003) Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem* 278: 19134-19140
- Barksdale AR, Bernard AC, Maley ME, Gellin GL, Kearney PA, Boulanger BR, Tsuei BJ, and Ochoa JB (2004) Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. *Surgery* 135: 527-535
- Barnes PJ and Belvisi MG (1993) Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 48: 1034-1043
- Barnes PJ (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8: 183-192
- Baydoun AR, Bogle RG, Pearson JD, and Mann GE (1994) Discrimination between citrulline and arginine transport in activated murine macrophages: inefficient synthesis of NO from recycling of citrulline to arginine. *Br J Pharmacol* 112: 487-492
- Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, and Pfeilschifter J (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 202: 645-653
- Bergeron C, Boulet LP, Page N, Laviolette M, Zimmermann N, Rothenberg ME, and Hamid Q (2007) Influence of cigarette smoke on the arginine pathway in asthmatic airways: increased expression of arginase I. *J Allergy Clin Immunol* 119: 391-397

- Berkman N, Robichaud A, Robbins RA, Roesems G, Haddad EB, Barnes PJ, and Chung KF (1996) Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. *Immunology* 89: 363-367
- Bitzer M, von GG, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, and Bottinger EP (2000) A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 14: 187-197
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916
- Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S, and Mann GE (1992) L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem J* 284 (Pt 1): 15-18
- Bosse Y and Rola-Pleszczynski M (2007) Controversy surrounding the increased expression of TGF beta 1 in asthma. *Respir Res* 8: 66
- Boucher JL, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu JP, Yapo A, and Mansuy D (1994) N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1614-1621
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, and Michel FB (1992) Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 47: 3-11
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, and Vignola AM (2000) Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-1745
- Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, and Baud L (1995) Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 155: 2077-2084
- Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, and Roche WR (1990) Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 507-511
- Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, and Kolb-Bachofen V (2003) 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

- Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, and Ignarro LJ (1996) Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 271: H1988-H1998
- Canty EG and Kadler KE (2005) Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 118: 1341-1353
- Carraway MS, Piantadosi CA, Jenkinson CP, and Huang YC (1998) Differential expression of arginase and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res* 24: 253-268
- Chang CI, Liao JC, and Kuo L (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274: H342-H348
- Chang CI, Zoghi B, Liao JC, and Kuo L (2000) The involvement of tyrosine kinases, cyclic AMP/protein kinase A, and p38 mitogen-activated protein kinase in IL-13-mediated arginase I induction in macrophages: its implications in IL-13-inhibited nitric oxide production. *J Immunol* 165: 2134-2141
- Chang CI, Liao JC, and Kuo L (2001) Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* 61: 1100-1106
- Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, and Vignola AM (2001) Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 85-93
- Chowdhury S, Gotoh T, Mori M, and Takiguchi M (1996) CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) binds and activates while hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) does not bind but represses the liver-type arginase promoter. *Eur J Biochem* 236: 500-509
- Clancy RM, Amin AR, and Abramson SB (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 41: 1141-1151
- Closs EI, Lyons CR, Kelly C, and Cunningham JM (1993) Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem* 268: 20796-20800
- Closs EI, Simon A, Vekony N, and Rotmann A (2004) Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr* 134: 2752S-2759S
- Cohn L, Tepper JS, and Bottomly K (1998) IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol* 161: 3813-3816

- Coleman CS, Hu G, and Pegg AE (2004) Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem J* 379: 849-855
- Colleluori DM and Ash DE (2001) Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochemistry* 40: 9356-9362
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, and Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174: 231-235
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, and Modolell M (1995) Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 667-673
- Cox JD, Kim NN, Traish AM, and Christianson DW (1999) Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat Struct Biol* 6: 1043-1047
- Cox JD, Cama E, Colleluori DM, Pethe S, Boucher JL, Mansuy D, Ash DE, and Christianson DW (2001) Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase. *Biochemistry* 40: 2689-2701
- Curran JN, Winter DC, and Bouchier-Hayes D (2006) Biological fate and clinical implications of arginine metabolism in tissue healing. *Wound Repair Regen* 14: 376-386
- Daghigh F, Fukuto JM, and Ash DE (1994) Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 174-180
- Dai Y, Datta S, Novotny M, and Hamilton TA (2003) TGFbeta inhibits LPS-induced chemokine mRNA stabilization. *Blood* 102: 1178-1185
- de Boer J, Meurs H, Coers W, Koopal M, Bottone AE, Visser AC, Timens W, and Zaagsma J (1996) Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. *Br J Pharmacol* 119: 1109-1116
- de Boer J, Duyvendak M, Schuurman FE, Pouw FM, Zaagsma J, and Meurs H (1999) Role of L-arginine in the deficiency of nitric oxide and airway hyperreactivity after the allergen-induced early asthmatic reaction in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 128: 1114-1120
- Deignan JL, Livesay J, Shantz LM, Pegg AE, O'brien W, Iyer R, Cederbaum S, and Grody W (2007) Polyamine Homeostasis in Arginase Knockout Mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(4): C1296-301

- Deng WG, Zhu Y, and Wu KK (2004) Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 103: 2135-2142
- Derynck R and Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584
- Deves R and Boyd CA (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 78: 487-545
- DiChiara MR, Kiely JM, Gimbrone MA, Jr., Lee ME, Perrella MA, and Topper JN (2000) Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med* 192: 695-704
- Doherty T and Broide D (2007) Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 19(6): 676-80
- Dupont LJ, Rochette F, Demedts MG, and Verleden GM (1998) Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naive patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 894-898
- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, and Schafer AI (2001) Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation* 103: 1121-1127
- Durante W, Johnson FK, and Johnson RA (2007) Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 906-911
- Duvernelle C, Freund V, and Frossard N (2003) Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 16: 181-196
- Elgun S and Kumbasar H (2000) Increased serum arginase activity in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 227-232
- Endo M, Oyadomari S, Terasaki Y, Takeya M, Suga M, Mori M, and Gotoh T (2003) Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L313-L321
- Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, and Kleinert H (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 50: 1321-1332

- Gilbert RS and Herschman HR (1993) Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 380-384
- Gotoh T, Araki M, and Mori M (1997) Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 487-491
- Gotoh T and Mori M (1999) Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 144: 427-434
- Grasemann H, Schwiertz R, Matthiesen S, Racké K, and Ratjen F (2005) Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1523-1528
- Gray MJ, Poljakovic M, Kepka-Lenhart D, and Morris SM, Jr. (2005) Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta. *Gene* 353: 98-106
- Griffith OW and Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57: 707-736
- Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, and Ignarro LJ (1993) Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 151: 6329-6337
- Grody WW, Dizikes GJ, and Cederbaum SD (1987) Human arginase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 13: 181-214
- Hamelmann E and Gelfand EW (2001) IL-5-induced airway eosinophilia - the key to asthma? *Immunol Rev* 179: 182-191
- Hammermann R, Bliesener N, Mössner J, Klasen S, Wiesinger H, Wessler I, and Racké K (1998) Inability of rat alveolar macrophages to recycle L-citrulline to L-arginine despite induction of argininosuccinate synthetase mRNA and protein, and inhibition of nitric oxide synthesis by exogenous L-citrulline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 601-607
- Hammermann R, Hirschmann J, Hey C, Mössner J, Folkerts G, Nijkamp FP, Wessler I, and Racké K (1999) Cationic proteins inhibit L-arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells. Implications for nitric oxide synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 155-162



- Hammermann R, Dreissig MD, Mössner J, Fuhrmann M, Berrino L, Göthert M, and Racké K (2000a) Nuclear factor-kappa B 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
- Hammermann R, Hey C, Schäfer N, and Racké K (2000b) Phosphodiesterase inhibitors and forskolin up-regulate arginase activity in rabbit alveolar macrophages. *Pulm Pharmacol Ther* 13: 141-147
- Hansen G, Berry G, Dekruyff RH, and Umetsu DT (1999) Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103: 175-183
- Hausmann EH, Hao SY, Pace JL, and Parmely MJ (1994) Transforming growth factor beta 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Infect Immun* 62: 3625-3632
- Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, and Racké K (1995) Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 359: 251-254
- Hey C, Wessler I, and Racké K (1995) Nitric oxide synthase activity is inducible in rat, but not rabbit alveolar macrophages, with a concomitant reduction in arginase activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351: 651-659
- Hey C, Boucher JL, Vadon-Le GS, Ketterer G, Wessler I, and Racké K (1997) Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D,L-inosipicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 121: 395-400
- Hibbs JB, Jr., Vavrin Z, and Taintor RR (1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138: 550-565
- Hobbs AJ, Higgs A, and Moncada S (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 191-220
- Hoet PH and Nemery B (2000) Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L417-L433
- Hoffmann F (2007) Prevalence of asthma among German adults: analysis of the German National Telephone Survey. *J Asthma* 44: 433-436

- Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, and Davies DE (2004) Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc* 1: 93-98
- Ignarro LJ (1990) Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol* 67: 1-7
- Isoime M, Lortie MJ, Murakami Y, Parisi E, Matsufuji S, and Satriano J (2007) The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C705-C711
- Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, and Barnes PJ (2002) A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8921-8926
- Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, Grody WW, and Cederbaum S (1998) The human arginases and arginase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 21 Suppl 1: 86-100
- Iyer RK, Kim HK, Tsoa RW, Grody WW, and Cederbaum SD (2002) Cloning and characterization of human agmatinase. *Mol Genet Metab* 75: 209-218
- Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, and Barnes PJ (1998) Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 53: 91-95
- Jeffery PK (2001) Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164: S28-S38
- Jenkinson CP, Grody WW, and Cederbaum SD (1996) Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114: 107-132
- Johnson PR and Burgess JK (2004) Airway smooth muscle and fibroblasts in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 4: 102-108
- Kakuda DK, Sweet MJ, MacLeod CL, Hume DA, and Markovich D (1999) CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem J* 340 (Pt 2): 549-553
- Kämpfer H, Pfeilschifter J, and Frank S (2003) Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair. *J Invest Dermatol* 121: 1544-1551

- Kanyo ZF, Chen CY, Daghigh F, Ash DE, and Christianson DW (1992) Crystallization and oligomeric structure of rat liver arginase. *J Mol Biol* 224: 1175-1177
- Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, and Christianson DW (1996) Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 383: 554-557
- Kaysen GA and Strecker HJ (1973) Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J* 133: 779-788
- Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Wu G, and Morris SM, Jr. (2000) Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R2237-R2242
- Kerwin JF, Jr., Lancaster JR, Jr., and Feldman PL (1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38: 4343-4362
- Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, and Barnes PJ (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343: 133-135
- Kim NN, Cox JD, Baggio RF, Emig FA, Mistry SK, Harper SL, Speicher DW, Morris SM, Jr., Ash DE, Traish A, and Christianson DW (2001) 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
- Kips JC (2001) Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* 34: 24s-33s
- Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J, and Racké K (2001) Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 132: 1349-1357
- Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, and Förstermann U (1996) In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 271: 6039-6044
- Kleinert H, Schwarz PM, and Förstermann U (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384: 1343-1364
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, and Schwarz PM (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500: 255-266
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, and Moilanen E (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 471-479

- Koschorreck S, Wenzel F, Fuhrmann M, and Racké K (2003) Effects of phosphodiesterase inhibitors on L-arginine pathways in rat alveolar macrophages. *Eur J Pharmacol* 471: 229-236
- Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, Huynh ML, Zhou X, Hu H, and Wenzel SE (2006) Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 1208-1215
- Kurosawa M, Shimizu Y, Tsukagoshi H, and Ueki M (1992) Elevated levels of peripheral-blood, naturally occurring aliphatic polyamines in bronchial asthmatic patients with active symptoms. *Allergy* 47: 638-643
- Li H, Meininger CJ, Hawker JR, Jr., Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM, Jr., and Wu G (2001) Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E75-E82
- Li H, Romieu I, Sienna-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Estela DR-N, Kistner EO, Gjessing HK, Lara-Sanchez IC, Chiu GY, and London SJ (2006) Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 117: 119-126
- Li X and Stark GR (2002) NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30: 285-296
- Lindemann D and Racké K (2003) Glucocorticoid inhibition of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) induced up-regulation of arginase in rat airway fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368: 546-550
- Lindemann D, Matthiesen S, Warnken M, Fuhrmann M, and Racké K (2004) Down-regulation of iNOS expression and NO synthesis in rat primary airway fibroblasts by Th2 cytokines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: R79
- Louis CA, Reichner JS, Henry WL, Jr., Mastrofrancesco B, Gotoh T, Mori M, and Albina JE (1998) Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. *Am J Physiol* 274: R775-R782
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Luiking YC and Deutz NE (2007) Biomarkers of arginine and lysine excess. *J Nutr* 137: 1662S-1668S

- Maarsingh H, Zuidhof AB, Bos IS, van Duin M, Boucher JL, Zaagsma J, and Meurs H (2008) Arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 565-573
- Makinde T, Murphy RF, and Agrawal DK (2007) The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol* 85: 348-356
- Malerba G and Pignatti PF (2005) A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 46: 93-104
- Massague J and Wotton D (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19: 1745-1754
- Matthiesen S, Lindemann D, Warnken M, Juergens UR, and Racké K (2008) Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Eur J Pharmacol* 579: 403-410
- Messeri-Dreissig MD, Hammermann R, Mössner J, Göthert M, and Racké K (2000) In rat alveolar macrophages lipopolysaccharides exert divergent effects on the transport of the cationic amino acids L-arginine and L-ornithine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361: 621-628
- Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer MA, Macic L, Molendijk N, and Zaagsma J (2002) Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* 136: 391-398
- Meurs H, Maarsingh H, and Zaagsma J (2003) Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 24: 450-455
- Mistry SK, Burwell TJ, Chambers RM, Rudolph-Owen L, Spaltmann F, Cook WJ, and Morris SM, Jr. (2002) Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G375-G381
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, and Eichmann K (1995) 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
- Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012

- Mori M, Gotoh T, Nagasaki A, Takiguchi M, and Sonoki T (1998) Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. *J Inherit Metab Dis* 21 Suppl 1: 59-71
- Mori M and Gotoh T (2000) Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 715-719
- Mori M and Gotoh T (2004) Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr* 134: 2820S-2825S
- Mori M (2007) Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 137: 1616S-1620S
- Morris SM, Jr. (1992) Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 12: 81-101
- Morris SM, Jr., Bhamidipati D, and Kepka-Lenhart D (1997) Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 193: 157-161
- Morris SM, Jr., Kepka-Lenhart D, and Chen LC (1998) Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am J Physiol* 275: E740-E747
- Morris SM, Jr. (2004a) Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 134: 2743S-2747S
- Morris SM, Jr. (2004b) Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7: 45-51
- Morris SM, Jr. (2006) Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* 83: 508S-512S
- Morris SM, Jr. (2007) Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr* 137: 1602S-1609S
- Mössner J, Hammermann R, and Racké K (2001) Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 297-305
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273
- Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, Luckner C, Doschko G, Soler G, Eichmann K, Muller FM, Ho AD, Goerner M, and Modolell M (2005) Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105: 2549-2556

- Musikacharoen T, Yoshikai Y, and Matsuguchi T (2003) Histone acetylation and activation of cAMP-response element-binding protein regulate transcriptional activation of MKP-M in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 278: 9167-9175
- Naito K, Skog S, Tribukait B, Anderson L, and Hisazumi H (1987) Cell cycle related <sup>3</sup>H-Thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet.* 20: 447-457
- Nathan C and Xie QW (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918
- Nicholson B, Manner CK, and MacLeod CL (2002) Cat2 L-arginine transporter-deficient fibroblasts can sustain nitric oxide production. *Nitric Oxide* 7: 236-243
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, and Murphy TJ (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90: 2092-2096
- O'Byrne PM (2006) Cytokines or their antagonists for the treatment of asthma. *Chest* 130: 244-250
- Ohtake A, Takiguchi M, Shigeto Y, Amaya Y, Kawamoto S, and Mori M (1988) Structural organization of the gene for rat liver-type arginase. *J Biol Chem* 263: 2245-2249
- Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, and Raspanti M (2002) Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* 33: 587-596
- Pauleau AL, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS, and Murray PJ (2004) Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* 172: 7565-7573
- Perozich J, Hempel J, and Morris SM, Jr. (1998) Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochim Biophys Acta* 1382: 23-37
- Pohjanpelto P (1976) Putrescine transport is greatly increased in human fibroblasts initiated to proliferate. *J Cell Biol* 68: 512-520
- Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, and Huang YC (1998a) Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 275: L96-102

- Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, and Huang YC (1998b) Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 275: L96-102
- Racké K, Hey C, Mössner J, Hammermann R, Stichnote C, and Wessler I (1998) Activation of L-arginine transport by protein kinase C in rabbit, rat and mouse alveolar macrophages. *J Physiol* 511 (Pt 3): 813-825
- Racké K, Haag S, Bahulayan A, and Warnken M (2008) Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378(2): 193-201
- Reczkowski RS and Ash DE (1994) Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 312: 31-37
- Reynolds HY (2005) Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 98-102
- Ricciardolo FL, DiMaria GU, Mistretta A, Sapienza MA, and Geppetti P (1997) Impairment of bronchoprotection by nitric oxide in severe asthma. *Lancet* 350: 1297-1298
- Ricciardolo FL (2003) cNOS-iNOS paradigm and arginase in asthma. *Trends Pharmacol Sci* 24: 560-561
- Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, and Folkerts G (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84: 731-765
- Ricciardolo FL, Zaagsma J, and Meurs H (2005) The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 1221-1231
- Ricciardolo FL, DiStefano A, Sabatini F, and Folkerts G (2006) Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* 533: 240-252
- Roche WR, Beasley R, Williams JH, and Holgate ST (1989) Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1: 520-524
- Saetta M and Turato G (2001) Airway pathology in asthma. *Eur Respir J Suppl* 34: 18s-23s
- Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, and Giaid A (1998) Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 12: 929-937



- Salimuddin, Nagasaki A, Gotoh T, Isobe H, and Mori M (1999) Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 277: E110-E117
- Sato H, Fujiwara M, and Bannai S (1992) Effect of lipopolysaccharide on transport and metabolism of arginine in mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 52: 161-164
- Satriano J (2004) Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* 26: 321-329
- Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, and Bohme E (1988) Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 154: 213-216
- Schmidt HH (1994) [NO, endogenous messenger and cell poison]. *Med Monatsschr Pharm* 17: 168-185
- Schuiling M, Meurs H, Zuidhof AB, Venema N, and Zaagsma J (1998) Dual action of iNOS-derived nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1442-1449
- Scolnick LR, Kanyo ZF, Cavalli RC, Ash DE, and Christianson DW (1997) Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry* 36: 10558-10565
- Scotton CJ and Chambers RC (2007) Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 132: 1311-1321
- Seifter E, Rettura G, Barbul A, and Levenson SM (1978) Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* 84: 224-230
- Seiler N and Dezeure F (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 22: 211-218
- Shah N, Thomas T, Shirahata A, Sigal LH, and Thomas TJ (1999) Activation of nuclear factor kappaB by polyamines in breast cancer cells. *Biochemistry* 38: 14763-14774
- Shantz LM and Pegg AE (1999) Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 107-122

- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, and Caldwell MD (1997) Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 272: E181-E190
- Shi O, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr., and O'Brien WE (1998) Structure of the murine arginase II gene. *Mamm Genome* 9: 822-824
- Shi Y and Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700
- Sonoki T, Nagasaki A, Gotoh T, Takiguchi M, Takeya M, Matsuzaki H, and Mori M (1997) 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
- Sparkes RS, Dizikes GJ, Klisak I, Grody WW, Mohandas T, Heinzmann C, Zollman S, Lusic AJ, and Cederbaum SD (1986) The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23. *Am J Hum Genet* 39: 186-193
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, and Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7773-7777
- Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C, and Vane JR (1994) The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br J Pharmacol* 113: 757-766
- Takiguchi M, Haraguchi Y, and Mori M (1988) Human liver-type arginase gene: structure of the gene and analysis of the promoter region. *Nucleic Acids Res* 16: 8789-8802
- Takiguchi M and Mori M (1991) In vitro analysis of the rat liver-type arginase promoter. *J Biol Chem* 266: 9186-9193
- Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, and Boucher JL (1999) Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. *Nitric Oxide* 3: 427-438
- Thomas T and Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58: 244-258
- Toews GB (2001) Cytokines and the lung. *Eur Respir J Suppl* 34: 3s-17s

- Tomkinson A, Duez C, Cieslewicz G, Pratt JC, Joetham A, Shanafelt MC, Gundel R, and Gelfand EW (2001) A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 166: 5792-5800
- Trackman PC (2005) Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem* 96: 927-937
- Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, and Misra MK (2004) Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J Biomed Biotechnol* 2004: 227-237
- Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, and Dekruyff RH (2002) Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 3: 715-720
- Vakonakis I and Campbell ID (2007) Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol* 19: 578-583
- van der Rest M and Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J* 5: 2814-2823
- Ventura G, De Bandt JP, Segaud F, Perret C, Robic D, Levillain O, Le PS, Godard C, Cynober L, and Moinard C (2008) Overexpression of ornithine aminotransferase: consequences on amino acid homeostasis. *Br J Nutr* 1-9
- Vignola AM, Gagliardo R, Siena A, Chiappara G, Bonsignore MR, Bousquet J, and Bonsignore G (2001) Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 1: 108-115
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, and Nathan C (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 178: 605-613
- Waddington SN, Tam FW, Cook HT, and Cattell V (1998) Arginase activity is modulated by IL-4 and HOArg in nephritic glomeruli and mesangial cells. *Am J Physiol* 274: F473-F480
- Waddington SN and Cattell V (2000) Arginase in glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 8: 128-134
- Walker G, Pfeilschifter J, and Kunz D (1997) Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 272: 16679-16687

- Wallace HM, Fraser AV, and Hughes A (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376: 1-14
- Wang WW, Jenkinson CP, Griscavage JM, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, Cederbaum SD, and Ignarro LJ (1995) Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 1009-1016
- Warner SM and Knight DA (2008) Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 44-48
- Warnken M, Haag SD, Matthiesen S, and Racké K (2007) Arginase isoenzymes show differential expression and function in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375: 67
- Wei LH, Jacobs AT, Morris SM, Jr., and Ignarro LJ (2000) IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C248-C256
- Wei LH, Wu G, Morris SM, Jr., and Ignarro LJ (2001) Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9260-9264
- Weiland SK and Pearce N (2004) Asthma prevalence in adults: good news? *Thorax* 59: 637-638
- Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA, and Lee ME (2000) Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 275: 36653-36658
- Willis BC and Borok Z (2007) TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L525-L534
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, and Donaldson DD (1998) Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282: 2258-2261
- Wills-Karp M (1999) Immunologic basis of antigen-induced airway hyper-responsiveness. *Annu Rev Immunol* 17: 255-281
- Wilson JW and Bamford TL (2001) Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 229-247
- Witte MB, Barbul A, Schick MA, Vogt N, and Becker HD (2002) Upregulation of arginase expression in wound-derived fibroblasts. *J Surg Res* 105: 35-42

- Wolf C, Bruss M, Hanisch B, Gothert M, von Kügelgen I, and Molderings GJ (2007) Molecular basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic, and neuronal origin. *Mol Pharmacol* 71: 276-283
- Wu G and Morris SM, Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1): 1-17
- Wu G, Flynn NE, and Knabe DA (2000) Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E395-E402
- Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, and Zweier JL (1996) Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6770-6774
- Xia Y and Zweier JL (1997) Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6954-6958
- Yang M, Hogan SP, Henry PJ, Matthaei KI, McKenzie AN, Young IG, Rothenberg ME, and Foster PS (2001) Interleukin-13 mediates airways hyperreactivity through the IL-4 receptor-alpha chain and STAT-6 independently of IL-5 and eotaxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 522-530
- Yang M, Rangasamy D, Matthaei KI, Frew AJ, Zimmermann N, Mahalingam S, Webb DC, Tremethick DJ, Thompson PJ, Hogan SP, Rothenberg ME, Cowden WB, and Foster PS (2006) Inhibition of arginase I activity by RNA interference attenuates IL-13-induced airways hyperresponsiveness. *J Immunol* 177: 5595-5603
- Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, McLeod C, Palacin M, Modolell M, Lloberas J, and Celada A (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J Immunol* 176: 5918-5924
- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, and Kawai C (1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* 266: 12544-12547
- Zhang HY and Phan SH (1999) Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 658-665
- Zhu MY, Iyo A, Piletz JE, and Regunathan S (2004) Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim Biophys Acta* 1670: 156-164

Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, and Rothenberg ME (2003) Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 111: 1863-1874

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AHR	Hyperreagibilität der Atemwege
AnA	Anacardic Acid
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveolarlavage
BEC	S-(2-Boronoethyl)-L-cystein
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	cationic amino acid transporter
CBP	CREB-binding protein
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutiv exprimierte NO-Synthasen
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP response element binding protein
CTF/NF-1	CCAAT-binding transcription factor/nuclear factor-1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFMO	$\alpha$ -Difluoromethylornithin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FKS	fetales Kälberserum
FMN	Flavin-mononukleotid
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GRE	Glucocorticoid responsive element
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HNF-4	Hepatocyte nuclear factor 4
HWZ	Halbwertszeit
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISPF	$\alpha$ -Isonitrosopropiophenon
JAK	Januskinase
kb	kilobase
L-NAME	N <sup><math>\omega</math></sup> -Nitro-L-argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEM	Minimal Essential Medium Eagle
MKP	MAP Kinase Phosphatase
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NOHA	N <sup><math>\omega</math></sup> -Hydroxy-L-arginin
norNOHA	N <sup><math>\omega</math></sup> -Hydroxy-nor-L-arginin
NRE	NF $\kappa$ B responsive element
OAT	Ornithinaminotransferase
ODC	Ornithindecaboxylase
P5C	Pyrrolin-5-carboxylat



PBS	Phosphate buffered saline
PCAF	p300/CBP-associated factor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI	Proteaseinhibitoren
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAM	primäre Alveolarmakrophagen der Ratte
rFb	primäre Atemwegsfibroblasten der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standard Error of the Mean
SBE	Smad binding element
SDS	Sodiumdodecylsulfat
αSMA	α-Smooth Muscle Actin
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline + Tween
TCA	Trichloressigsäure
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th <sub>1</sub>	T-Helferzellen Typ 1
Th <sub>2</sub>	T-Helferzellen Typ 2
TLR	Toll Like Rezeptor
TSA	Trichostatin
UTR	Untranslatierte Region