

**Charakterisierung der Wirkung von GM-CSF
auf Arginase I und induzierbare NO-Synthase
in Alveolar-Makrophagen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Martin Heideking
aus Nürtingen
2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Racké
2. Gutachter: PD Dr. D. Skowasch

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.04.2011

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. A. Pfeifer

INHALTSVERZEICHNIS

A.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
B.	EINLEITUNG.....	6
I.	Arginin-Stoffwechsel.....	7
II.	Arginase.....	7
	1. Regulation der Arginase-Enzyme	11
III.	Die Familie der NO-Synthasen	12
	1. nNOS und eNOS.....	13
	2. iNOS	14
	3. Funktion der iNOS.....	16
	4. NO in der Physiologie der Lunge	17
	5. Koexpression von Arginase und iNOS	18
IV.	GM-CSF	19
	1. GM-CSF Signaltransduktion	20
	2. GM-CSF in der Physiologie der Lunge	22
V.	Chromatin-Remodeling.....	24
VI.	Zielsetzung	27
C.	MATERIAL UND METHODEN	28
1.	MATERIAL	28
	1.1 Chemikalien und Enzyme	28
	1.2 Lösungen und Puffer.....	31
	3. Primer	36
	4. Testsubstanzen	37
	5. Arbeitsmaterial und Geräte	38
II.	METHODEN	39
	1. Präparation und Kultur von Alveolarmakrophagen der Ratte.....	39
	2. Enzym-Assays	40
	4. RNA-Präparation	42
	5. RNA-Konzentrationsbestimmung.....	42
	6. Reverse Transkription (RT-Reaktion)	43

7. PCR-Reaktion und anschließende Gelelektrophorese.....	44
8. Statistik und Berechnung.....	47
D. ERGEBNISSE.....	48
I. Funktionelle Untersuchungen der Arginase und iNOS.....	48
1. Aktivität der Arginase und iNOS unter der Wirkung von LPS.....	48
2. Aktivität der Arginase und iNOS unter der Wirkung von GM-CSF.....	50
3. LPS- bzw. GM-CSF-Effekte in Kombination mit Dexamethason.....	52
4. GM-CSF-Effekte in Kombination mit NF- κ B-Inhibitoren.....	56
5. LPS- bzw. GM-CSF-Effekte in Kombination mit Anacardic Acid.....	58
II. Untersuchungen zur Expression von Arginase I und iNOS.....	63
1. Einfluss von LPS auf die Transkription der Arginase I.....	64
2. Einfluss von GM-CSF auf die Transkription der Arginase I.....	67
3. Einfluss von LPS auf die Transkription der iNOS.....	70
4. Einfluss von GM-CSF auf die Transkription der iNOS.....	73
E. DISKUSSION.....	76
I. GM-CSF-Effekt auf Expression von Arginase I und iNOS.....	76
I.1 Einfluß von Glukokortikoiden auf den GM-CSF-Effekt.....	79
I.2 Einflüsse von NF- κ B-Inhibitoren auf den GM-CSF-Effekt.....	81
I.3 Einflüsse von HAT-Inhibitoren auf den GM-CSF-Effekt.....	82
II. GM-CSF-Effekt auf Arginase I und iNOS: funktionelle Bedeutung.....	84
II.1 GM-CSF-vermittelte Induktion der iNOS.....	84
II.2 GM-CSF-vermittelte Induktion der Arginase I.....	85
II.3 Koexpression von Arginase und iNOS durch GM-CSF bei Asthma bronchiale.....	86
F. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
G. LITERATURVERZEICHNIS.....	92
H. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	109
I. DANKSAGUNG.....	110

A. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Anacardic Acid
ARG	Arginase
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HDAC	Histon-Deacetylase
LPS	Lipopolysaccharid
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
cNOS	konstitutive NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RAM	Primäre Rattenalveolarmakrophagen
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transkription

B. EINLEITUNG

Mit der Entdeckung der drei Isoenzyme der NO-Synthasen (NOS) Anfang der neunziger Jahre kam großes Interesse am Stoffwechsel der Aminosäure L-Arginin auf. Die NO-Synthasen nutzen dieses Substrat zur Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), einem einfachen kleinen Molekül mit geringer Halbwertszeit und hoher Reaktivität, das eine überraschende Vielfalt biologischer Funktionen erfüllt (Knowles und Moncada, 1994). In den folgenden Jahren wurde die Rolle des NO, und damit der NO-Synthasen, in so verschiedenen Feldern wie Neurotransmission, Blutdruckregulation und als Effektormolekül des angeborenen Immunsystems erkannt und erforscht. Die präzisen Aufgaben, die Stickstoffmonoxid unter verschiedenen physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen erfüllt, erfordern eine ebenso präzise Kontrolle der Synthese dieses Moleküls. Von den drei Isoenzymen der NO-Synthase werden zwei konstitutiv exprimiert. Die Aktivität dieser als cNOS bezeichneten Enzyme wird vornehmlich posttranslational durch kurzfristige Änderungen des intrazellulären Kalziumspiegels reguliert. Dem gegenüber steht ein induzierbares Isoenzym (Stuehr et al., 1991), dessen Funktion in der lang anhaltenden Synthese großer Mengen von NO als antimikrobiellem, zytotoxischem Effektormolekül der Makrophagen und Granulozyten im Kampf gegen eindringende Pathogene wie Bakterien oder Pilze besteht. Die Regulation der iNOS erfolgt im Gegensatz zu den beiden cNOS in erster Linie auf Ebene der Genexpression. Eine Vielzahl von Zytokinen und weiteren Botenstoffen vermag unter bestimmten Bedingungen die iNOS in Zellen des angeborenen Immunsystems zu induzieren. Eine zweite Möglichkeit, die Aktivität der NO-Synthasen zu regulieren, besteht in einer Begrenzung des zur Verfügung stehenden Substrats L-Arginin. Ein weiteres L-Arginin-verwertendes Enzym ist die Arginase (Jenkinson et al., 1996). Während dieses Enzym mit seiner Fähigkeit, ein Harnstoffmolekül von der Trägersubstanz L-Arginin abzuspalten, seit langem als Komponente des Harnstoffzyklus der Leber bekannt ist, kam mit Entdeckung der NO-Synthasen neues Interesse an möglichen extrahepatischen Funktionen der Arginase auf. In Zellen, die sowohl Arginase als auch iNOS exprimieren, konkurrieren beide Enzyme um L-Arginin, was Möglichkeiten komplexer gegenseitiger Beeinflussung der verschiedenen L-Arginin-Stoffwechselwege eröffnet. Das Zytokin GM-CSF ist ein zentraler Regulator der Reifung und Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen, den Zellen des angeborenen Immunsystems (Hamilton und Anderson, 2004). Neue Untersuchungen belegen, dass GM-CSF neben dieser physiologischen Funktion aber auch in die Pathogenese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen ver-

strickt ist. Speziell im Falle des Asthma bronchiale sind erhöhte GM-CSF-Konzentrationen an der Einleitung und Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündungsreaktion beteiligt (Gajewska et al., 2003).

Da induzierbare NO-Synthase und Arginase in asthmatischen Atemwegen vermehrt exprimiert werden, befasst sich diese Arbeit mit dem Einfluss von GM-CSF auf die Expression beider Enzyme in Alveolarmakrophagen der Ratte (RAM). Im Rahmen dieser Einleitung werden zunächst beide Enzyme charakterisiert und ihre jeweiligen Funktionen, speziell auch im Falle einer parallelen Expression, erörtert. Im Anschluss folgt eine Beschreibung des Zytokins GM-CSF, seiner bekannten Effekte auf Makrophagen und seiner Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale.

I. Arginin-Stoffwechsel

Der gesunde Erwachsene ist in der Lage durch endogene *de novo* Synthese den Bedarf des Körpers an L-Arginin zu decken. Dies trifft nicht zu für Kinder im Wachstum sowie für Erwachsene unter katabolem Stress. In diesen Situationen ist der Körper auf eine exogene Zufuhr der Aminosäure angewiesen, weswegen L-Arginin als eine semiessentielle Aminosäure klassifiziert wird (Morris, Jr., 2006). Der L-Arginin-Pool des Organismus setzt sich zusammen aus exogen mit der Nahrung zugeführtem Protein, endogener Synthese und aus dem Abbau von Protein. Neben der Einschleusung in die Proteinbiosynthese existieren vier Enzyme, über die L-Arginin verstoffwechselt werden kann: So wird L-Arginin über die Arginin-Decarboxylase in das biogene Amin Agmatin überführt oder über die Arginin-Glycin-Amidino-transferase zu Creatin verstoffwechselt. Des Weiteren dient die Aminosäure als Substrat für die beiden bereits erwähnten Enzyme Arginase und NO-Synthase. Als Produkt der Arginase entsteht dabei neben Harnstoff auch L-Ornithin. In der Leber geht L-Ornithin im Rahmen des Harnstoffzyklus erneut in die L-Arginin-Synthese ein, während es in extrahepatischen Geweben als Ausgangspunkt für die Synthese von Glutamat, L-Prolin oder verschiedenen Polyaminen dient (Morris, Jr., 2006).

II. Arginase

Die Arginasen sind eine Gruppe von Enzymen, die die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff katalysieren. Sie sind weit verbreitet im gesamten evolutionären Spektrum, von Bakterien über Fungi und Pflanzen hin zu weiten Teilen des Tierreichs (Grody

et al., 1987; Takiguchi et al., 1989). Durch die Abspaltung des Harnstoffs von seinem Trägermolekül L-Arginin kommt den Arginasen eine zentrale Rolle im Stickstoffmetabolismus zu. In höheren Lebewesen stellt die durch die Arginase katalysierte Reaktion den letzten Schritt im Harnstoffzyklus dar, der die Ausscheidung des toxischen Ammoniaks in Form des wasserlöslichen, nichttoxischen Harnstoffs im Urin ermöglicht.

In Säugetieren werden zwei Isoformen des Enzyms unterschieden. Bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts ist die hepatische Arginase bekannt. Als ein Schlüsselenzym des Harnstoffzyklus ist sie in der Leber in hohen Konzentrationen nachweisbar. Darüber hinaus wurde Arginase-Aktivität aber auch in anderen Organen beschrieben. In der Ratte konnte Arginase in geringerer Aktivität in Gewebeproben u.a. aus Gehirn, Niere, Dünndarm (Jenkinson et al., 1996) Speicheldrüse, Pankreas (Herzfeld und Raper, 1976) und Makrophagen (Currie, 1978) nachgewiesen werden. In den 70er Jahren wurde erstmals die Vermutung geäußert, dass die in der Niere gemessene Arginase-Aktivität einem zweiten Isoenzym zuzuschreiben sei (Kaysen und Strecker, 1973). Der Grund hierfür waren Unterschiede in physikochemischen Eigenschaften, immunologischem Verhalten und Ansprechen auf bestimmte Inhibitoren zwischen renaler und hepatischer Arginase. Zudem zeigte sich in Patienten mit der seltenen Hyperargininämie, einem Defekt im Gen der hepatischen Arginase, eine gewisse verbleibende Arginase-Aktivität in der Niere. Schließlich konnte ein zweites Isoenzym charakterisiert werden, das zur Abgrenzung gegenüber der hepatischen Arginase (Arginase I) als extrahepatische Arginase bzw. Arginase II bezeichnet wurde (Grody et al., 1989; Spector et al., 1983). Die beiden Arginasen unterscheiden sich darüber hinaus auch in ihrer intrazellulären Lokalisation. Während die Arginase I im Zytosol lokalisiert ist, findet sich die Arginase II ausschließlich in den Mitochondrien (Kaysen und Strecker, 1973).

Als Metalloenzym ist die katalytische Aktivität der Arginase an die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen gebunden. Mn(II)-Ionen sind der physiologische Kofaktor und wichtig für die Thermostabilität des Proteins (Grody et al., 1987; Scolnick et al., 1997). Die dreidimensionale Struktur der Arginase wurde durch Röntgenstrukturanalysen ermittelt, wodurch sich zeigte, dass das Enzym in Form eines Homotrimers vorliegt, wobei jede Untereinheit zwei Mn(II)-Ionen in Form eines „binuklearen Mangan-Clusters“ bindet. Diese räumliche Struktur ermöglicht die Fixierung eines Hydroxid-Ions, welches die beiden Mn(II)-Ionen symmetrisch bindet (Kanyo et al., 1992; Kanyo et al., 1996). Durch die Bindung zwischen den beiden Metallionen wird das Hydroxid-Ion aktiviert und optimal für die Katalyse ausgerichtet. Als katalytischer Mechanismus wurde ein nukleophiler Angriff des Hydroxid-Ions am Guanidin-

Kohlenstoff des Arginin, gefolgt von Protonentransfer und Dissoziation der Produkte, postuliert (Kanyo et al., 1996).

Sämtliche bisher untersuchten Arginase-Gene zeigen eine ausgeprägte allgemeine Sequenzkonservierung und eine Reihe von Sequenzregionen mit hoher Homologie (Perozich et al., 1998). So wurde für die humane Arginase der Leber und das Enzym der Hefe eine 40%ige Homologie bestimmt (Schrell et al., 1989). Auch die kinetischen Eigenschaften von Arginase unterschiedlicher Herkunft zeigen große Ähnlichkeit. Für Säugetier-Arginase wurden in der Literatur für L-Arginin Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) zwischen ca. 1-50 mM und basische pH-Optima von ca. 9,5-10,5 beschrieben (Jenkinson et al., 1996).

In Sequenzvergleichen unter 31 Vertretern der Arginase-Familie aus weiten Teilen des Tierreichs konnten Perozich et al. eine ausgeprägte Homologie zwischen den entsprechenden Isoformen verschiedener Spezies beschreiben, wohingegen die verschiedenen Isoformen einer Spezies eine deutlich höhere Variabilität zeigten (Perozich et al., 1998). So stimmt die Arginase-I des Menschen zu 86% mit dem Isoenzym von Ratte und Maus überein. Zwischen den beiden humanen Isoenzymen dagegen besteht nur eine Homologie von 53%, wobei jedoch die für die enzymatische Funktion relevanten Aminosäuren zu 100% konserviert blieben (Vockley et al., 1996). Diese Beobachtung ließ sich auch beim Vergleich mit Arginase-Sequenzen von Nicht-Säugetieren, wie z.B. *Xenopus laevis*, bestätigen. Demnach sind die jeweiligen Arginase-Typen von Mensch und *Xenopus* näher miteinander verwandt als Typ I und II der jeweiligen Spezies untereinander. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Entwicklung der beiden Isoenzyme die Folge einer Gen-Duplikation ist, die sich noch vor der Divergenz von Amphibien und Säugetieren ereignete (Perozich et al., 1998). Aus dieser deutlichen Trennung der beiden Isoformen innerhalb einer Spezies kann auf Unterschiede in der Rolle von Arginase I und II im Stoffwechsel höherer Lebewesen geschlossen werden.

Die ursprüngliche Annahme, die beobachtete extrahepatische Arginase-Aktivität gehe vollständig auf die Arginase II zurück, musste im Laufe der Zeit relativiert werden. Zwar wird die Arginase I in erster Linie in der Leber exprimiert, doch auch in extrahepatischen Geweben konnte dieses Isoenzym isoliert werden, darunter Erythrozyten (Terasaki et al., 1980), und Makrophagen (Sonoki et al., 1997). Neuere Untersuchungen bestätigten darüber hinaus eine konstitutive Expression der Arginase I in einer Reihe von Zellen des Respirationstraktes, v.a. Bronchialepithelzellen, Endothelzellen, (Myo-)Fibroblasten und Alveolarmakrophagen (Klasen et al., 2001; Lindemann und Racke, 2003; Que et al., 1998).

Arginase II findet sich in der Leber nur in sehr geringer Menge, wird aber in einer Vielzahl extrahepatischer Gewebe exprimiert, v.a. in Niere, Gehirn und Prostata, und in geringerer Menge in einer Reihe weiterer Gewebe (Gotoh et al., 1997a; Morris, Jr. et al., 1997; Vockley et al., 1996) einschließlich Makrophagen (Wang et al., 1995). In der Lunge findet sich für Arginase II ein vergleichbares Verteilungsmuster wie für Arginase I (Que et al., 1998).

Neuere Untersuchungen mit verfeinerten Methoden lassen allerdings Zweifel aufkommen an den ursprünglich vermuteten unterschiedlichen Gewebeverteilungen und Funktionen der beiden Isoenzyme. Yu et al. demonstrierten durch in-situ-Hybridisierung und RT-PCR eine weit reichende Arginase I-Expression in einer Vielzahl extrahepatischer Gewebe der Maus, darunter Speicheldrüsen, Ösophagus, Magenschleimhaut und Monozyten / Makrophagen. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit Arginase II ausschließlich in Niere und Dünndarm identifiziert werden (Yu et al., 2003). Diese und weitere Ergebnisse widersprechen der ursprünglichen Vorstellung von einer strikten Trennung in die Harnstoff synthetisierende Arginase I und die biosynthetisch aktive Arginase II (Cederbaum et al., 2004). Die genauen Aufgaben der extrahepatischen Arginase sowie deren Gewebeverteilung sind nach wie vor nicht endgültig geklärt. Die scheinbar deutlich weitere Verbreitung der Arginase II im Vergleich zur Arginase I legte die Vermutung nahe, dass diesem Isoenzym eine weit umfangreichere metabolische Funktion zukommt als die der Harnstoffsynthese (Vockley et al., 1996). Eine eindeutige Differenzierung der Funktionen beider Isoenzyme steht in Anbetracht der unklaren Gewebeverteilung allerdings weiterhin aus und Überschneidungen im Wirkprofil beider Isoenzyme in extrahepatischen Geweben sind nicht auszuschließen (Cederbaum et al., 2004).

In Geweben, die keinen vollständigen Harnstoffzyklus exprimieren, wird für die Arginasen eine Reihe von biosynthetischen Funktionen diskutiert. Anders als in der Leber könnte L-Ornithin das entscheidende Produkt dieser Arginasen sein. L-Ornithin wiederum kann über die Ornithin-Aminotransferase zu L-Glutamat und L-Prolin verstoffwechselt werden. L-Glutamat ist ein wichtiges Intermediärprodukt im Protein- und Energiestoffwechsel während L-Prolin eine essentielle Komponente vieler Proteine mit struktureller Funktion darstellt, allen voran des Kollagens. Alternativ dient L-Ornithin als Substrat für die Ornithin-Decarboxylase. Über diesen Stoffwechselweg wird L-Arginin der Synthese von Polyaminen zugeführt, die wiederum grundlegende zelluläre Prozesse wie Wachstum und Proliferation steuern (Jenkinson et al., 1996). Eine weitere, und eventuell die bedeutsamste, Funktion der extrahepatischen Arginase wird heute in der Regulation der Synthese von NO durch die NO-Synthase gesehen.

1. Regulation der Arginase-Enzyme

Der komplette Satz Enzyme für den Harnstoffzyklus wird in den periportalen Hepatozyten der Leber exprimiert und in geringer Aktivität auch in Enterozyten des Dünndarms (Wu, 1995). Während die funktionelle Reserve des Harnstoffzyklus ausreicht, um auf kurzfristig erhöhte Ammoniakkonzentrationen zu reagieren, erfolgt seine langfristige Regulation in erster Linie auf Ebene der Gentranskription (Beliveau et al., 1993; Takiguchi und Mori, 1995). Die Expression der beteiligten Enzyme erfolgt dabei koordiniert in Abhängigkeit von metabolischen Ansprüchen durch Änderungen der alimentären Proteinzufuhr, erhöhten Katabolismus sowie durch hormonelle Faktoren wie Glukokortikoide, Glukagon, Schilddrüsenhormone und cAMP (Jenkinson et al., 1996; Morris, Jr., 1992).

Entsprechend der Vorstellung, die extrahepatische Arginase diene einer anderen Funktion als das hepatische Enzym, wurde hier auch eine anderweitige Regulation der Genexpression vermutet. Am intensivsten untersucht wurde in dieser Hinsicht die Expression der Arginase in Makrophagen, wobei frühe funktionelle Untersuchungen neben einer konstitutiven Arginase-Aktivität in murinen Peritonealmakrophagen auch eine Induktion des Enzyms als Antwort auf Stimulation durch LPS demonstrierten (Currie, 1978; Granger et al., 1990; Ryan et al., 1980). Aufbauend auf diese Ergebnisse konnten als weitere Induktoren der Arginase in Makrophagen die Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und Prostaglandin E2 (Corraliza et al., 1995; Munder et al., 1998), Transforming Growth Factor- β (Boutard et al., 1995) sowie auch Hypoxie (Louis et al., 1998) und Trauma identifiziert werden (Ochoa et al., 2001). Kürzlich konnte auch IL-5, ein neues Mitglied der IL-17-Familie, als Induktor der Arginase I-Expression in der Mauslunge identifiziert werden (Sharkhuu et al., 2006).

In weiterführenden Untersuchungen wurde verstärkt auf die differenzierte Expression der beiden Arginase-Isoenzyme geachtet, wobei sich ein komplexes, teilweise Gewebe- und Spezies-spezifisches Expressionsmuster für Arginase I und II ergab. In Peritonealmakrophagen der Ratte konnte nach Stimulation durch LPS und IL-4 eine Induktion ausschließlich der Arginase I beobachtet werden (Louis et al., 1999; Sonoki et al., 1997). In Alveolarmakrophagen der Ratte hingegen wird nach LPS-Stimulation zusätzlich Arginase II exprimiert, wenngleich deutlich schwächer als Arginase I (Klasen et al., 2001).

In murinen Peritonealmakrophagen zeigte sich neben einer induzierbaren Arginase I-Expression eine konstitutive Expression von Arginase II (Louis et al., 1998). Andere Versuche ergaben eine zeitlich versetzte Induktion beider Isoenzyme in Makrophagen der Maus durch LPS, wobei in der frühen Phase Arginase II verstärkt exprimiert wird und erst im An-

schluss Arginase I (Salimuddin et al., 1999). In der murinen Zelllinie RAW 264.7 hingegen scheint auf Stimulation durch LPS ausschließlich Arginase II exprimiert zu werden (Gotoh et al., 1996; Wang et al., 1995). Weiterführende Untersuchungen ergaben allerdings, dass durch Stimulation mit cAMP zusätzlich zu Arginase II auch Arginase I in dieser Zelllinie induzierbar ist (Morris, Jr. et al., 1998). Diese Vielzahl unterschiedlicher Ergebnisse belegt die äußerst differenzierte und gewebe- sowie speziesabhängige Regulation der beiden Arginase-Isoenzyme.

Wei et al. konnten an glatten Muskelzellen der Rattenaorta demonstrieren, dass die Induktion der Arginase I durch IL-4 und IL-13 auf einer Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionswege JAK/STAT6 und cAMP/PKA basiert (Wei et al., 2000). Dieser Mechanismus wurde auch in murinen Makrophagen bestätigt (Rutschman et al., 2001). Weiterführende Untersuchungen zur Regulation des Arginase I-Gens durch IL-4 führten zur Beschreibung eines 3kb vor dem Transkriptionsstart liegenden Response Elements, das sowohl STAT6 als auch die Transkriptionskofaktoren C/EBP β und PU.1 bindet und so Arginase-Expression induziert (Gray et al., 2005; Pauleau et al., 2004).

III. Die Familie der NO-Synthasen

Die NO-Synthasen (NOS) bilden eine Enzymfamilie, die die Synthese von NO aus L-Arginin katalysiert. Drei Isoformen sind in Säugetieren beschrieben worden, deren Gene auf verschiedenen Chromosomen kodiert sind.

Die Nomenklatur der drei bekannten Isoenzyme richtet sich nach der Reihenfolge der Erstbeschreibung (NOS I-III), nach dem prototypischen Zelltyp, aus dem das jeweilige Isoenzym ursprünglich isoliert wurde, und nach dem vorwiegenden Mechanismus ihrer Regulation. Die neuronale NOS (nNOS bzw. NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS bzw. NOS III) werden in ihren jeweiligen Geweben konstitutiv exprimiert und daher auch gemeinsam als konstitutive NOS (cNOS) bezeichnet in Abgrenzung zur induzierbaren NOS (iNOS bzw. NOS II), die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden kann.

Die NOS Gene besitzen eine ähnliche genomische Struktur, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist. Dennoch konnte mit der Klonierung der Gene gezeigt werden, dass es sich um drei separate Enzyme handelt, wobei die humanen Isoformen untereinander eine Homologie zwischen 51% und 57% aufweisen (Knowles und Moncada, 1994).

Die bekannten NOS liegen in einer homodimeren Form vor. Jede Untereinheit besitzt eine N-terminale Oxygenase-Domäne, die Bindungsstellen für Tetrahydrobiopterin, Häm und

L-Arginin aufweist. Über eine Calmodulin-Bindungsstelle ist die Oxygenase-Domäne verbunden mit einer C-terminalen Reduktase-Domäne mit Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH (Ghosh und Stuehr, 1995;McMillan und Masters, 1995). Durch Übertragung von Elektronen von NADPH über FAD auf FMN und schließlich weiter auf das Häm-Eisen katalysiert NOS die Synthese von NO und Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff über das Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin (Stuehr, 1999).

1. nNOS und eNOS

NOS I war das erste Isoenzym, das gereinigt und kloniert werden konnte. Ursprünglich wurde es aus dem Zerebellum von Schwein und Ratte isoliert (Bredt und Snyder, 1990;Mayer et al., 1990;Schmidt et al., 1991), und wird daher auch als „neuronal“ NOS (nNOS) bezeichnet. Im Folgenden wurde das Isoenzym in weiteren Geweben nachgewiesen, darunter Rückenmark (Dun et al., 1992), sympathischen Ganglia und Nebennieren (Dun et al., 1993), Epithelzellen aus Lunge, Uterus und Magen (Asano et al., 1994;Schmidt et al., 1992), den Nervenfasern des iNANC-Systems (Ricciardolo, 2003) und in Skelettmuskel (Nakane et al., 1993). Die Isoform des Gehirns ist ein weitgehend gelöst vorliegendes Enzym mit einer Molekülmasse von 150 - 160 kDa (Schmidt et al., 1991). Das 28 Exon umfassende humane nNOS-Gen befindet sich auf Chromosom 12 und besitzt eine Länge von 100 kB (Fujisawa et al., 1994).

Im Folgenden konnte eine weitere konstitutiv exprimierte NO-Synthase isoliert werden, deren Aktivität vornehmlich im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Salter et al., 1991). Dieses Isoenzym wurde in einer Vielzahl von Spezies nahezu ausschließlich in Endothelzellen verschiedener Gefäßtypen beschrieben (Pollock et al., 1993), was ihre primäre Rolle in der Regulation des Gefäßtonus widerspiegelt und ihr die Bezeichnung „endotheliale“ NO-Synthase (eNOS) einbrachte. In geringerem Ausmaß wurde eine eNOS-Expression unter anderem auch in Tubulusepithelzellen der Niere (Tracey et al., 1994), in Bindegewebszellen des Kolon (Xue et al., 1994) sowie im Hippokampus und weiteren Hirnregionen der Ratte (Dinerman et al., 1994) bestätigt. Aufgrund ihrer weit reichenden Expression und hohen Aktivität in Gehirn und Muskulatur ist davon auszugehen, dass eNOS für den Großteil der konstitutiven NO-Synthase-Aktivität im Menschen verantwortlich ist (Knowles und Moncada, 1994). Das Gen für die humane eNOS liegt auf Chromosom 7 und besteht aus 26 Exons auf einer Länge von 21 kB (Marsden et al., 1993). Das Enzym besitzt eine Molekülmasse von 135 kDa und zeigt im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen vor allem partikuläre Aktivität (Forstermann et al., 1991).

Den beiden beschriebenen Isoenzymen gemeinsam ist ihre konstitutive Expression in den jeweiligen Geweben und die Kalzium/Calmodulin-Abhängigkeit ihrer Aktivität. Nur nach Rezeptor-vermitteltem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentrationen kann Calmodulin an das Enzym binden, während in Gegenwart basaler Kalziumkonzentrationen Calmodulin von dem Enzym dissoziiert (Forstermann et al., 1991). Die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen werden als low-output Isoformen bezeichnet, eine Einteilung, die sich vornehmlich auf die Dauer der NOS-Aktivität in den Zellen unter physiologischen Bedingungen bezieht. Da die Aktivität der cNOS von Kalzium-erhöhenden Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin abhängig ist, ist eine Steigerung der NO-Synthese jeweils nur von kurzer, wenige Minuten anhaltender Dauer (Malinski und Taha, 1992). Die geringe Menge an NO, die so entsteht, aktiviert die Guanylat-Zyklase und erhöht dadurch das intrazelluläre cGMP (Moncada et al., 1991). Auf diese Weise sind die beiden cNOS-Isoformen beteiligt an homöostatischen Prozessen wie Neurotransmission, Peristaltik und kurzfristiger Blutdruckregulation (Nathan und Xie, 1994).

2. iNOS

Die induzierbare NO-Synthase (NOS II) kann von einer Vielzahl von Geweben als Antwort auf inflammatorische oder immunologische Stimuli exprimiert werden. Neben der Tatsache, dass sie in der Regel nicht konstitutiv exprimiert wird, unterscheidet sie sich von den beiden anderen Isoformen vor allem durch ihre weit reichende Gewebeverteilung und durch ihre Wirkkinetik. Eine Induktion der iNOS führt zu einer starken, mehrere Tage anhalten Synthese von NO (Vodovotz et al., 1994). Dies erklärt sich durch die Fähigkeit der iNOS, Calmodulin bereits in Gegenwart der geringen basalen Kalziumkonzentration ruhender Zellen außergewöhnlich fest zu binden (Cho et al., 1992). Dadurch ist die Aktivität des Enzyms unabhängig vom intrazellulären Kalziumspiegel. Der entscheidende Schritt in der Regulation der iNOS-Aktivität besteht somit in der Kontrolle der Expression des Enzyms, und findet nicht, wie bei den beiden konstitutiv exprimierten Isoformen, auf einer posttranslationalen Ebene statt (Xie et al., 1992).

iNOS wurde erstmals aus murinen Makrophagen isoliert (Stuehr et al., 1991) und bald darauf kloniert (Xie et al., 1992). Es folgte die Charakterisierung des Enzyms der Ratte (Nunokawa et al., 1993) und des Menschen (Chartrain et al., 1994). Das humane iNOS-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und besteht aus 26 Exons auf einer Länge von 37 kB (Marsden et al., 1994).

Mittels immunohistochemischer Lokalisation von iNOS in Ratten, die mit *Propionibacterium acnes* und LPS behandelt wurden, konnte das Enzym in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, darunter Monozyten und Granulozyten der Milz, verschiedenen Zellen der Leber und des Kolons (Bandaletova et al., 1993) sowie Makrophagen und Bronchialepithel der Lunge (Ricciardolo et al., 2004). Untersuchungen zur iNOS-Expression in humanen Zellen ergaben ein vergleichbar diverses Bild (Geller und Billiar, 1998).

Am ausgiebigsten untersucht wurde die iNOS in Makrophagen von Maus und Ratte. Diese Studien brachten Einblick in die vielfältigen Regulationsmechanismen des Enzyms. Die iNOS-Aktivität wird in erster Linie gesteuert über die Expression des Genes. Eine posttranslationale Regulation, wie durch die intrazelluläre Kalzium-Konzentration bei eNOS und nNOS, findet kaum statt. In unstimulierten Zellen wird iNOS in der Regel nur in sehr geringen Mengen oder überhaupt nicht exprimiert (Forstermann et al., 1995). Eine Ausnahme stellt das Bronchialepithel dar, in dem eine anhaltende, konstitutive iNOS-Expression nachgewiesen werden konnte (Guo et al., 1995). Die ersten beschriebenen Induktoren der iNOS-Expression in Makrophagen und weiteren Zellen waren LPS und Zytokine wie IL-1, IFN- γ und TNF- α (Forstermann et al., 1995; Stuehr und Marletta, 1985; Xie und Nathan, 1994). Dabei variieren die Zytokine, bzw. Zytokin-Kombinationen, die eine iNOS-Expression induzieren, je nach Spezies und Zelltyp. Zusätzlich sind in einigen Zellen neben Zytokinen auch andere Wirkstoffe in der Lage, iNOS zu induzieren, so zum Beispiel cAMP-bildende oder Proteinkinase C stimulierende Substanzen und Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF (Gilbert und Herschman, 1993; Hortelano et al., 1993).

Die Promoterregionen des iNOS-Gens von Maus (Lowenstein et al., 1993), Mensch (Zhang et al., 1996) und Ratte (Eberhardt et al., 1996) wurden charakterisiert. Sie enthalten mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Enzyms beteiligt sind, darunter NF- κ B, AP-1 sowie verschiedene Mitglieder C/EBP-, ATF/CREB- und STAT-Familien. Unter diesen Bindungsstellen scheinen nur die beiden NF- κ B-Bindungsstellen und die Aktivierung eines neuen LPS-Response-Elements (LRE_{AA}) (Xie, 1997) an der Induktion des iNOS-Genes nach Stimulation durch LPS in murinen Makrophagen beteiligt zu sein.

Die dem Transkriptionsstartpunkt näher gelegene NF- κ B-Bindungsstelle ist dabei essentiell für die LPS-induzierte Transkription des iNOS-Gens (Xie und Nathan, 1994), während die weiter stromaufwärts gelegene NF- κ B-Bindungsstelle eine „Enhancer“-Funktion vermittelt somit die maximale Expression des iNOS-Gens zu steigern vermag (Kim et al., 1997).

Gleichzeitig gibt es eine Vielzahl von Substanzen, die die Induktion des iNOS-Gens zu unterdrücken vermögen. Hierzu zählen vor allem die Glukokortikoide, deren hemmender Einfluss auf die iNOS-Expression vielfach beschrieben wurde (DiRosa et al., 1990; Radomski et al., 1990). Neben den Glukokortikoiden wurde eine Gruppe von Zytokinen, bestehend aus IL-4, IL-8, IL-10, Monocyte Chemotactic Protein-1 und Macrophage Deactivating Factor als Inhibitoren der iNOS-Induktion in Makrophagen und Neutrophilen identifiziert (Forstermann et al., 1995). Weitere Wachstumsfaktoren, die die Transkription des Gens in Makrophagen und/oder anderen Zellen unterdrücken, sind TGF- β , PDGF, IGF und FGF (Forstermann et al., 1995).

Der hemmende Einfluss der Glukokortikoide beruht dabei nicht auf einer direkten Interaktion des Glukokortikoidrezeptors mit dem iNOS-Gen. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine indirekte Hemmung der Gentranskription durch eine Beeinflussung der iNOS-induzierenden Transkriptionsfaktoren. Ein solcher Mechanismus ist ausführlich beschrieben für die Bindung des aktivierten Glukokortikoidrezeptors an die p65-Untereinheit von NF- κ B (Kleinert et al., 1996).

3. Funktion der iNOS

Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten NOS I und III, deren Funktion in der Kontrolle physiologischer Vorgänge liegt, dient die induzierbare NO-Synthase in erster Linie der Produktion großer Mengen NO im Rahmen pathophysiologischer Prozesse. In diesem Zusammenhang kommt den phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems, speziell den Makrophagen, eine zentrale Rolle zu, da sie nach entsprechender Stimulation fähig sind, über einen längeren Zeitraum eine ausgeprägte NO-Synthase zu unterhalten (Nathan, 1992; Stuehr und Marletta, 1985).

Zusammen mit den ebenfalls von Makrophagen gebildeten Sauerstoff-Radikalen entstehen nach der Synthese von NO spontan oder durch Katalyse eine Reihe weiterer reaktiver Intermediate wie Stickstoffdioxid, Dinitrotrioxid und Peroxinitrit (Xia und Zweier, 1997). Diese Radikale wirken direkt zytotoxisch durch Inaktivierung von Proteinen, Beeinträchtigung der DNA-Synthese und -Reparatur und durch Inhibition der Zellatmung (Fang, 2004). Diese unspezifische Wirkung der Radikale verleiht den Makrophagen eine potente Waffe im Kampf gegen eine Vielzahl verschiedener Erreger, darunter Bakterien, Viren und Helminthen, sowie auch gegen Tumorzellen (De Groote und Fang, 1995; Nathan und Hibbs, Jr., 1991). Gleichzeitig geht mit dieser unspezifischen Zytotoxizität aber auch die Gefahr einher, körpereigene

Zellen zu schädigen. Eine übermäßige NO-Produktion ist in diesem Zusammenhang bei einer Reihe chronisch-entzündlicher und Autoimmunerkrankungen zu beobachten (Clancy et al., 1998). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die gesteigerte NO-Synthese im Rahmen verschiedener Infektionskrankheiten, so z.B. viralen und bakteriellen Pneumonien oder der Pneumokokkenmeningitis, verbunden ist mit einer vermehrten Gewebsschädigung und dass in einigen Tiermodellen dieser Infektionen die Unterdrückung der NO-Synthese sowohl das Ausmaß der Gewebsschädigung als auch die Mortalität senken konnte (Fang, 2004). Eine einfache Bewertung der Synthese von NO im Rahmen von Entzündungsprozessen ist somit nicht möglich. Vielmehr muss Nutzen und Gefahr einer erhöhten Produktion von Stickstoffradikalen unter verschiedenen Bedingungen der Immunaktivierung differenziert beurteilt werden.

4. NO in der Physiologie der Lunge

Anfang der 90er Jahre wurden erste Beobachtungen gemacht, die darauf hinwiesen, dass NO eine Funktion sowohl in der Physiologie als auch in der Pathophysiologie der Lunge zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass NO in der Atemluft verschiedener Säugetiere und auch des Menschen vorhanden ist (Gustafsson et al., 1991), und dass die Menge an ausgeatmetem NO bei Patienten, die an Asthma bronchiale litten, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht ist (Persson et al., 1994). Die genaue Funktion von NO in den Atemwegen und die Rolle der einzelnen Isoenzyme an verschiedenen (patho-) physiologischen Vorgängen zu bestimmen, erwies sich allerdings als äußerst schwierig.

Alle drei NOS-Isoformen werden in der Lunge exprimiert. eNOS konnte nachgewiesen werden im Endothel pulmonaler Gefäße (Giaid und Saleh, 1995) sowie auch im Bronchialepithel und Typ 2 Alveolarepithelzellen (Shaul et al., 1994). nNOS ist in erster Linie lokalisiert in Nerven des inhibitorischen nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Systems (iNANC) der Lunge von Mensch und Tier (Ricciardolo, 2003). Diese Nervenfasern befinden sich in der glatten Muskulatur der Atemwege, wo NO den maßgebenden Vermittler der neuronalen Relaxation der bronchialen Muskulatur darstellt (Belvisi et al., 1992). Eine Verminderung des endogenen, durch cNOS synthetisierten NO führt zu Bronchokonstriktion und Hyperreaktivität der Atemwege (Maarsingh et al., 2006; Ricciardolo et al., 2001), was die protektive Funktion der cNOS in der Physiologie der Lunge belegt.

iNOS kann nach entsprechender Stimulation in einem weiten Spektrum von Zellen des Atemtraktes nachgewiesen werden, darunter Typ II Alveolarepithelzellen, Fibroblasten, glatte

Muskelzellen, Bronchialepithelzellen, Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten (Ricciardolo et al., 2006). Die bei Asthmatikern beobachtete erhöhte expiratorische NO-Konzentration scheint auf die vermehrte Expression von iNOS zurückzuführen zu sein (Saleh et al., 1998). Während physiologische Mengen an NO in den Atemwegen einen bronchoprotektiven Effekt haben, geht diese vermehrte Synthese einher mit Infiltration durch Entzündungszellen, Epithelschädigung und Schleimhautödem, wodurch sie zur bronchialen Hyperreaktivität beiträgt (Meurs et al., 2003). Andere Autoren schreiben aber auch dem durch iNOS produzierten NO einen gewissen bronchodilatierenden Effekt zu (de Gouw et al., 1998), und argumentieren, dass die Hyperreagibilität der Atemwege in erster Linie auf der gesteigerten Produktion von Peroxynitrit (OONO^\cdot) beruht, welches durch Reaktion von NO mit Superoxid entsteht (de Boer et al., 2001; Saleh et al., 1998).

5. Koexpression von Arginase und iNOS

Werden in einer Zelle gleichzeitig sowohl Arginase als auch iNOS exprimiert, ergibt sich eine Situation, in der die beiden Enzyme in direkter Konkurrenz um das gemeinsame Substrat L-Arginin stehen. Zwar liegt der K_m -Wert der Arginase für L-Arginin im niedrigen millimolaren Bereich und damit deutlich unter dem der NOS (im niedrigen mikromolaren Bereich), doch die wesentlich höhere V_{\max} der Arginase gewährleistet unter physiologischen Bedingungen einen in etwa gleich schnellen Substratumsatz beider Enzyme (Griffith und Stuehr, 1995; Wu und Morris, Jr., 1998). Somit ist durchaus zu erwarten, dass es im Falle einer parallelen Induktion beider Enzyme L-Arginin zu einem limitierenden Faktor für die Aktivität der iNOS und Arginase wird. Da die Freisetzung großer Mengen von Stickstoffradikalen einhergeht mit der Gefahr, neben Pathogenen auch körpereigene Zellen und Gewebe zu schädigen, ist eine effektive Regulation der NO-Produktion von besonderer Bedeutung für den Wirtsorganismus. Tatsächlich stellt die Induktion der Arginase einen wesentlichen Mechanismus zur Kontrolle der iNOS-Aktivität dar. So führt eine erhöhte Arginase-Aktivität zu einer verminderten NO-Synthese in Makrophagen (Hey et al., 1997; Modolell et al., 1995) und in Lungenpräparaten des Meerschweinchens (Meurs et al., 2000). Das Zusammenspiel von Arginase und iNOS beschränkt sich jedoch nicht auf die Abhängigkeit von dem gemeinsamen Substrat. N-Hydroxy-L-Arginin, ein Zwischenprodukt der NO-Synthese durch NOS, erweist sich als ein potenter Inhibitor der Arginase. Somit besteht die Möglichkeit, dass iNOS die Arginase-Aktivität negativ beeinflussen und dadurch den L-Arginin-Stoffwechsel in Richtung NO-Synthese verschieben kann (Hecker et al., 1995; Hey et al., 1997). Andererseits konnte gezeigt

werden, dass Spermin, ein Polyamin, das im weiteren Sinne ein Produkt der Arginase darstellt, die NO-Synthese in LPS-stimulierten Makrophagen unterdrückt (Southan et al., 1994; Mossner et al., 2001). Es bestehen also vielfältige Mechanismen gegenseitiger Beeinflussung zwischen Arginase und iNOS, was die große Bedeutung einer exakten Regulation des Arginin-Stoffwechsels, speziell in Bezug auf das Immunsystem, weiter unterstreicht.

Über die bisher genannten Möglichkeiten der gegenseitigen Beeinflussung der beiden Enzyme hinaus besteht in Makrophagen ein funktioneller Antagonismus zwischen der Th₁- und Th₂-Zell-vermittelten Immunantwort in Bezug auf die Induzierbarkeit der beiden Enzyme. Während Th₁-Zytokine wie IF- γ ausschließlich iNOS induzieren und keinen Effekt auf die Expression der Arginase haben, hemmen Th₂-Zytokine wie IL-4 und IL-10 die Expression der iNOS während sie Arginase I induzieren (Corraliza et al., 1995; Mills et al., 2000; Munder et al., 1999). Somit spiegelt die differenzierte Expression beider Enzyme auch unterschiedliche Aktivierungszustände des Immunsystems wider (Munder et al., 1998).

IV. GM-CSF

Granulozyten Makrophagen – Kolonie Stimulierender Faktor (GM-CSF) ist ein 23-kDa Glykoprotein, das erstmals in den 1970er Jahren aus dem Lungengewebe von Mäusen nach Stimulation mit LPS isoliert werden konnte (Burgess und Metcalf, 1977; Sheridan und Metcalf, 1973). Wie der Name impliziert, wurde GM-CSF ursprünglich als hämatopoetisches Zytokin beschrieben, das die Proliferation und Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen des Knochenmarks stimuliert (Sheridan und Metcalf, 1973).

Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass GM-CSF ebenso Einfluss nimmt auf die Eigenschaften der weiter differenzierten myeloischen Zellen. Tatsächlich scheint GM-CSF in der frühen Myelopoese keine essentielle Rolle zu spielen, denn Tierversuche mit mangelhafter GM-CSF-Expression zeigten eine unauffällige Hämatopoese (Stanley et al., 1994). Vielmehr versteht man GM-CSF heute als einen zentralen Regulator von Zellzahl und Aktivierungszustand der Granulozyten- und Makrophagen-Linien in allen Entwicklungsstufen (Hamilton und Anderson, 2004), und somit als einen wesentlichen Mediator der Immunaktivierung im Rahmen der unspezifischen Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen.

Unter dem Einfluss von GM-CSF steigt die Anzahl zirkulierender Granulozyten und Monozyten (Wing et al., 1989) und durch Unterbindung der Apoptose wird ihr Überleben verlängert (Dziedziczko und Palgan, 2004). GM-CSF aktiviert die unspezifische Immunabwehr durch zahlreiche Effekte auf die reifen hämatopoetischen Zellen. Hierzu zählt eine verstärkte

Sekretion chemotaktischer Botenstoffe und proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Leukotrien C₄ und TNF- α durch Granulozyten und Makrophagen, wodurch GM-CSF eine Amplifikation inflammatorischer Prozesse vermittelt (Fleetwood et al., 2005). Die vermehrte Expression von Oberflächenrezeptoren wie Toll-like receptor 4 (TLR4) und CD 14 auf Makrophagen ermöglicht die Identifikation von Pathogenen (Shibata et al., 2001). Des Weiteren bewirkt GM-CSF eine verstärkte Expression von Zelloberflächen-Adhäsionsmolekülen, z.B. β -Integrine, sowie von Rezeptoren für die Fc-Segmente von IgG und solchen für aktivierte Komplementfaktoren (Armitage, 1998). Durch letztere kommt es zu einer Steigerung der Phagozytosekapazität. GM-CSF steigert direkt das zytotoxische Potential von Alveolarmakrophagen u.a. durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen wie Superoxid und Hydrogenperoxid und unterstützt dadurch die effektive Eliminierung von Pathogenen aus der Lunge (LeVine et al., 1999). Von besonderer Bedeutung ist das Zytokin für die terminale Differenzierung von dendritischen Zellen (Zou und Tam, 2002) und Alveolarmakrophagen (Akagawa et al., 1988; Nakata et al., 1991; Shibata et al., 2001), zwei Zelltypen, denen im Immunsystem der Lunge wesentliche Aufgaben zukommen.

Neben diesen vorteilhaften Eigenschaften kann eine übermäßige Freisetzung von GM-CSF allerdings auch deletäre Effekte haben. So ist GM-CSF impliziert in der Pathogenese von rheumatoider Arthritis, Autoimmunerkrankungen, inflammatorischen Nierenerkrankungen und inflammatorischen Lungenerkrankungen wie COPD und Asthma (Hamilton und Anderson, 2004).

Während GM-CSF im peripheren Blut unterhalb der Nachweisgrenze bleibt, lassen sich lokal sehr hohe Konzentrationen des Zytokins messen, so z.B. in Hautbiopsien atopischer Patienten (Kay et al., 1991), in der Gelenkflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis (Williamson et al., 1988) und nicht zuletzt in der Lunge (Gajewska et al., 2003). Die Verteilung und Aktivität von GM-CSF ist also stark kompartimentiert, der Wirkmechanismus des Zytokins entspricht dabei einem parakrinen und/oder autokrinen Modell, nach dem das Zytokin lokal gebildet wird und seine Wirkung auf die benachbarten Zellen begrenzt bleibt (Gasson, 1991).

1. GM-CSF Signaltransduktion

Der GM-CSF-Rezeptor wird exprimiert in Vorläuferzellen der Makrophagen, Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten und darüber hinaus auch in ausgereiften Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Plasmazellen, einigen T-Lymphozyten und Gefäßendothelzellen (Armitage, 1998). Er gehört gemeinsam mit den Rezeptoren für IL-3

und IL-5 zur Klasse 1 der Zytokinrezeptor-Superfamilie (Bazan, 1990). Der Rezeptor setzt sich zusammen aus zwei transmembranösen Glykoprotein-Untereinheiten, der GM-CSF-spezifischen α -Rezeptor-Untereinheit ($R\alpha$) und der β -Untereinheit (β c), deren Nutzung GM-CSF mit IL-3 und IL-5 teilt. In der Zellmembran liegt die β -Untereinheit in Form eines stabilen Homodimers vor, der mit einem oder zwei α -Rezeptor-Untereinheiten einen trimere/tetrameren Rezeptorkomplex bildet. Beide Untereinheiten für sich zeigen nur eine geringe Affinität zu GM-CSF, während das Zytokin in Gegenwart des Komplexes aus $R\alpha$ und β c mit hoher Affinität gebunden wird (Ebner et al., 2003; Murphy und Young, 2006).

Bindung des Zytokins an seine $R\alpha$ -Untereinheit führt durch eine Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes zur Aktivierung der β -Untereinheit, die die Initiierung der intrazellulären Signaltransduktion vermittelt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass auch eine $R\alpha$ -spezifische Signaltransduktion möglich ist. Mehrere intrazelluläre Signaltransduktionswege sind für den GM-CSF-Rezeptor beschrieben, darunter JAK/STAT, MAPK, PI3-K und NF- κ B.

Die *Janus Kinase (JAK)/ Signal Transducer und Activator of Transkription (STAT)*-Signalkaskade wird von allen Zytokinen und einigen Wachstumsfaktoren genutzt, um extrazelluläre Signale über transmembranöse Rezeptoren direkt, ohne die Zwischenschaltung von Second Messengern, an Pomotoren von Zielgenen weiterzuleiten. JAK2 ist eine Tyrosinkinase, die nach Stimulation durch GM-CSF an die β -Untereinheit bindet, und durch Transphosphorylierung aktiviert wird (Guthridge et al., 1998; Woodcock et al., 1999). Anschließend phosphoryliert JAK2 Tyrosinreste der β -Untereinheiten, wodurch Bindungsstellen für Src-homology 2 (SH2) Domänen von Mitgliedern der STAT-Familie entstehen. Nach Tyrosinphosphorylierung durch die β -Untereinheiten bzw. auch direkt durch JAK2, dimerisieren die STATs und es folgt die Translokation in den Zellkern, wo sie an spezifische Enhancer-Sequenzen der Promoterregionen aktivierter Gene binden. Beschrieben wurde bisher eine Beteiligung der STATs 1 und 3 (Brizzi et al., 1996) sowie STAT 5 (Mui et al., 1995) an der GM-CSF-Signaltransduktion.

Unter den MAPK-Kaskaden rekrutiert der GM-CSF-Rezeptor v.a. den ERK-Pfad und die JNK/SAPK- und p38-Signalkaskaden. Diese Kaskaden werden wiederum von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen verwendet und spielen eine zentrale Rolle in Wachstum, Proliferation und Überleben der Zelle. Nach Aktivierung der β -Untereinheit durch JAK2 wird das Protein *Ras* rekrutiert, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, an deren Ende die Phosphorylierung/Aktivierung der Proteinkinasen *Extracellular Regulated Kinases 1 und 2* (ERK) steht. Die Substrate der ERKs befinden sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Zu den nukleären Substraten zählen v.a. die Transkriptionsfaktoren

ATF2 und TCF, die im weiteren Verlauf die Expression der Transkriptionsfaktoren c-FOS und c-Jun verstärken und dadurch die Zytokin-vermittelte Proliferation vermitteln.

Über die parallel aktivierte JNK/SAPK-Signalkaskade kommt es durch die Proteinkinase JNK zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun, während über die p38-Kaskade der Transkriptionsfaktor ATF aktiviert wird.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert eine Reihe von Genen, die an Immunreaktionen und Inflammation beteiligt sind. Die aktive Form von NF- κ B ist ein Heterodimer bestehend aus einer p50 und einer p65 Untereinheit. Im Zytosol liegt NF- κ B an den Inhibitor I- κ B gebunden in einer inaktiven Form vor. Um den Transkriptionsfaktor zu aktivieren, muss I- κ B durch spezifische Kinasen phosphoryliert und somit deaktiviert werden. Zu diesen Kinasen zählt auch der I- κ B Kinase Komplex, bestehend aus den drei Hauptkomponenten IKK α , IKK β und IKK γ . Eine Vielzahl externer Stimuli vermögen, diesen I- κ B Kinase Komplex zu aktivieren, darunter Wachstumsfaktoren, Zytokine oder auch UV-Strahlung. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass GM-CSF über die α -Untereinheit seines Rezeptors IKK β binden und aktivieren kann. Diese α -spezifische Signaltransduktion über IKK β könnte verantwortlich sein für die GM-CSF-spezifischen Effekte, die nicht bei IL-3 und IL-5 beobachtet werden (Ebner et al., 2003).

2. GM-CSF in der Physiologie der Lunge

GM-CSF ist von zentraler Bedeutung im Stoffwechsel der Lunge, sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen.

Im Gegensatz zu praktisch allen anderen Geweben lässt sich GM-CSF in der Lunge in einer geringen basalen Konzentration bereits unter physiologischen Bedingungen nachweisen (Bozinovski et al., 2002). Dies mag sich daraus erklären, dass der Großteil der Zellen des Respirationstraktes fähig ist, GM-CSF zu synthetisieren, darunter Monozyten/Makrophagen, B-Lymphozyten, Neutrophile, Eosinophile, Typ II-Alveolarzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und andere Epithelzellen (Smith et al., 1990;Tarr, 1996;Zucali et al., 1986).

GM-CSF kann sowohl die Funktion von Alveolarmakrophagen als auch das Wachstum von Alveolarepithel stimulieren (Akagawa et al., 1988;Huffman Reed et al., 1997) und spielt somit unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase. Ein Mangel an GM-CSF in der Lunge führt zum Krankheitsbild der alveolären Proteinose (Reed et al., 2000;Uchida et al., 2004), vermutlich auf Grund eines gestörten Surfactant-Katabolismus durch Alveolarmakrophagen. Im Kontext der Immunabwehr

vermittelt GM-CSF eine erhöhte antimikrobielle Aktivität der Alveolarmakrophagen gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen und ein Mangel an GM-CSF äußert sich in einer beeinträchtigten Eliminierung dieser Pathogene (Gonzalez-Juarrero et al., 2005; Jones, 1996; LeVine et al., 1999).

Aber nicht nur für die pulmonale Homöostase und die unspezifische Immunreaktion auf pathogene Keime ist GM-CSF von Bedeutung. Eine Vielzahl von Beobachtungen belegt eine zentrale Stellung des Zytokins auch in der Pathogenese allergischer Atemwegserkrankungen, allen voran des Asthma bronchiale.

Beim allergischen Asthma reagiert das Immunsystem der Lunge auf scheinbar harmlose Antigene mit einer pathologischen Th₂-gewichteten Entzündungsreaktion. Diese Reaktion findet in den drainierenden Lymphknoten statt, wenn Antigen-präsentierende Zellen, v.a. die ubiquitär in der Lunge vorhandenen Dendritischen Zellen (DC), nach Kontakt mit einem Allergen aus der bronchialen Mukosa in die Lymphknoten wandern, und dort naive T-Zellen mit spezifischen Anweisungen zu diesem Allergen informieren. Bei der Aktivierung von DC durch Allergene scheint GM-CSF eine entscheidende Funktion zuzukommen. Für viele Aeroallergene ist die Fähigkeit, in bronchialen Epithelzellen die Synthese von GM-CSF zu induzieren, belegt (Knight et al., 2000; Sun et al., 2001). Bei asthmatischen Patienten lässt sich regelmäßig eine erhöhte Produktion von GM-CSF in BAL, Sputum und zirkulierenden Monozyten/Makrophagen nachweisen (Ritz et al., 2002). Dabei korreliert die GM-CSF-Konzentration sowohl mit dem Grad der Lungeneosinophilie (Woolley et al., 1995) als auch mit dem Schweregrad der Erkrankung (Vignola et al., 1999). Wie bereits erwähnt, gilt GM-CSF als einer der potentesten natürlichen Aktivatoren von DCs, und der immunologische Kontext mit erhöhten GM-CSF-Konzentrationen, in dem DCs die Allergene in der Mukosa prozessieren, scheint die Weichen zu stellen für die anschließende Th₂-gerichtete Differenzierung der naiven T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten (Gajewska et al., 2003). Th₂-Zellen selber produzieren GM-CSF und eine Vielzahl weiterer Zytokine/Mediatoren (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), die in Epithelzellen die GM-CSF-Synthese induzieren (Gajewska et al., 2003). Da GM-CSF wiederum lebensverlängernd auf Lymphozyten und Granulozyten wirkt, entsteht so ein sich selbst erhaltendes immun-inflammatorisches Milieu. Im Rahmen dieser chronischen Entzündungsreaktion kommt es beim Asthma zu wiederholter Schädigung des Bronchialepithels und anschließenden Reparaturvorgängen, die, zumindest bei einem Teil der Patienten, zu einem strukturellen Umbau der Bronchialwand mit Hyperplasie von glatter Muskulatur und Becherzellen sowie einer Zunahme der extrazellulären Matrix führen (Chiappara et al., 2001). Diese als Atemwegs-Remodeling bezeichneten strukturellen Veränderungen können

zu einem fortschreitenden Verlust der Lungenfunktion führen und scheinen zur Entwicklung einer chronischen Hyperreaktivität beizutragen (Bousquet et al., 2000).

V. Chromatin-Remodeling

Innerhalb der eukaryoten Zelle wird die Erbinformation in Form der DNA in einem separaten Kompartiment, dem Zellkern, aufbewahrt. Um in diesem sehr geringen Raum unterzukommen, muss die DNA, die eine Länge von ungefähr einem Meter aufweist, um das 20,000-fache komprimiert werden. Dabei liegt die genetische Information im Zellkern nicht in einer proteinfreien Form vor. Vielmehr bildet die DNA mit einer Vielzahl von Proteinen einen Komplex, der als Chromatin bezeichnet wird und entscheidenden Einfluss nimmt auf die Kontrolle der einzelnen Gene (Nemeth und Langst, 2004).

Die Basiseinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Hierbei handelt es sich um einen DNA-Abschnitt mit einer Länge von 147 Basenpaaren der spiralförmig um ein Oktamer aus Histonen gewickelt ist. Histone stellen die hauptsächliche Proteinkomponente des Chromatins dar und zählen zu den am höchsten konservierten eukaryoten Proteinen überhaupt (Ouzounis und Kyrpides, 1996). Das Histonoktamer ist organisiert in ein zentrales (H3/H4)-Tetramer und zwei periphere H2A/H2B-Dimere und bindet DNA auf einer Länge von 147bp. Dabei wird die DNA 1,65-mal um das Nukleosom gewunden, wobei sie fünf- bis zehnfach komprimiert wird. Die Interaktionen von DNA und Histonoktamer werden stabilisiert durch zahlreiche direkte und indirekte Wechselwirkungen, die das Nukleosom zu einer stabilen Einheit machen. Die Nukleosomen sind untereinander verbunden durch kurze Segmente freier, so genannter Linker-DNA. Hierdurch entsteht der Eindruck, die Nukleosomen seien aufgereiht wie Perlen auf einer Kette. Diese Kette ist wiederum gefaltet zu einer dichten, kompakten Faser mit einem Durchmesser von ungefähr 30nm, wodurch insgesamt eine Komprimierung der DNA um das 50-fache resultiert. Die 30nm-Faser wird in ihrer Form stabilisiert durch die Bindung eines weiteren Histons, H1, an jedes Nukleosom. Die genaue Struktur dieser 30nm-Fasern, sowie die folgenden Stufen der höheren Organisation bis hin zur Stufe des Chromosoms sind nach wie vor nur unvollständig verstanden (Felsenfeld und Groudine, 2003; Nemeth und Langst, 2004).

Lange Zeit wurde die Hauptaufgabe der Histone in der Komprimierung der DNA gesehen. Doch die Erkenntnis, dass die Struktur des Chromatins keine statische Verpackung der DNA darstellt, sondern vielmehr dynamisch reguliert werden kann, sorgte in den letzten Jahren für

stetig zunehmendes Interesse an Histonen und ihrer Beteiligung an zentralen biochemischen Abläufen wie Genexpression und DNA-Replikation.

Stark komprimierte DNA kann nicht von der RNA-Polymerase II und Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Soll ein Gen exprimiert werden, muss das Chromatin an dieser Stelle entwunden werden. Verschiedene Typen von Proteinkomplexen sind fähig, solche Veränderungen am Chromatin vorzunehmen. Eine Familie beinhaltet Multiproteinkomplexe, die ATP-abhängig die Struktur des Nukleosoms beeinflussen (Vignali et al., 2000). Eine zweite Familie besteht aus Proteinkomplexen, die Histone kovalent zu modifizieren vermögen (Wu und Grunstein, 2000). Histone bestehen aus zwei funktionellen Domänen. Neben dem globulären Zentrum, das die Bildung des Oktamers und die DNA-Bindung vermittelt, verfügen sie über je einen N-terminalen und C-terminalen Arm („histone tails“), die die Hauptziele für eine posttranslationale Modifikation darstellen. Zu den möglichen kovalenten Veränderungen an diesen Armen zählen Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung (Wu und Grunstein, 2000). Dabei ist die reversible Acetylierung der N-terminalen Arme der Histone von zentraler Bedeutung für die Regulation der Transkription (Roth et al., 2001; Sterner und Berger, 2000). In aktiv transkribiertem Chromatin findet sich typischerweise eine Acetylierung der N-terminalen Lysinreste der Histone H3 und H4 (Hendzel et al., 1998; Katan-Khaykovich und Struhl, 2002). Deacetylierung der Histone hingegen zeigt den Zustand unterdrückter Genexpression an (Roth et al., 2001; Sterner und Berger, 2000). Dieser Zusammenhang ist schon seit langem bekannt (Allfrey et al., 1964), doch erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung der Histonacetylierung in der Steuerung der Genexpression erkannt.

Histonacetylierung wird vermittelt durch eine Klasse von Enzymen, die als Histon-Acetyltransferasen (HATs) bezeichnet werden. Sie katalysieren den Transfer einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die Lysingruppe am N-terminalen Arm des Histons. Acetylierung der Histone führt dabei über die Neutralisation der Histon-Ladung zur Abschwächung der Histon-DNA-Bindung und somit zur Öffnung der Chromatinstruktur, was die Transkription der DNA ermöglicht (Workman und Kingston, 1998). 1996 konnte erstmals für bekannte Transkriptionsfaktoren wie CBP und p300/CBP-associated factor eine intrinsische HAT-Aktivität beschrieben werden (Brownell et al., 1996; Janknecht und Hunter, 1996). Somit rekrutieren Transkriptionsfaktoren nach Bindung an DNA HAT-Aktivität an den Ort aktivierter Gen-Transkription.

Die Acetylierung von Histonen ist ein reversibler Vorgang. Um die Transkription eines Gens zu unterdrücken, kann einerseits die Aktivität der HATs negativ beeinflusst werden (Sterner

und Berger, 2000). Andererseits existiert eine Reihe von Enzymen mit spezifischer Histon-Deacetylase-Aktivität (HDACs). Somit stellen HATs und HDACs also zwei Regulationsmechanismen dar, die gemeinsam einen angemessenen Grad der Gentranskription sicherstellen (Kuo und Allis, 1998).

VI. Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, den Effekt des Zytokins GM-CSF auf Expression und Aktivität der beiden um L-Arginin konkurrierenden Enzyme Arginase I und induzierbare NO-Synthase zu charakterisieren. Weiterhin soll untersucht werden, welche intrazellulären Signaltransduktionswege die GM-CSF-Effekte vermitteln und speziell, ob bei der Aktivierung von Genen durch GM-CSF die Rekrutierung von Histon-Acetyl-Transferasen von Bedeutung ist.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1 Chemikalien und Enzyme

Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B, wasserlöslich	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin, Natrium Salt	Sigma-Aldrich, München
L-Arginin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Basismedium DMEM/HAM'S F-12	PAA, Cölbe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA (Albumin, bovin)	Sigma-Aldrich, München
D _c -Protein Assay Kit mit Reagenzien A,B,S	Bio-Rad, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA Ladder Ready-Load 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
DNA SmartLadder 200 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Disodium Salt	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, München
Harnstoff	Merck, Darmstadt
α -Isonitrosopropiophenon	Sigma-Aldrich, München

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Leupeptin (Hemisulfate Salt)	Sigma-Aldrich, München
Lipopolysaccharid von E.coli 0127.B8 (LPS)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid Hexahydrat (Mg Cl ₂ × 6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Mangan(II)chlorid Monohydrat (MnCl ₂ × H ₂ O)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Oligonukleotid (dT) 18	MWG, Ebersberg
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden
Penicillin / Streptomycin-Lösung (10.000 U ml ⁻¹ / 10 mg ml ⁻¹)	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphorsäure 85% (H ₃ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Protease	Sigma-Aldrich, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure 32% (konz. HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 95% (konz. H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Sulfanilamid	Merck, Darmstadt

Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (Tris HCl)	Boehringer, Ingelheim
Triton X-100	Boehringer, Ingelheim
Trypan Blue Stain (0,4%)	Sigma-Aldrich, München

1.2 Lösungen und Puffer

Lösungen für die Zellkultur:

10 x PBS (Phosphate buffered saline) –Puffer pH 7,4-7,5

KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
NaCl	1,38 M
Na ₂ HPO ₄	81 mM
Aqua bidest.	

Makrophagen-Kulturmedium

DMEM / Ham's F-12 [1:1] mit Glutamin

FKS	5% (v/v)
Penicillin /Streptomycin	100 U/ml // 100 µg/ml
Amphotericin B	5 µg/ml

0,15% Trypanblau Färbelösung

0,4% Trypan Blue Stain 3:8 verdünnt mit 1×PBS-Puffer

Lösungen für das Arginase-Assay:

L-Arginin-Lösung pH 9,7

L-Arginin Hydrochlorid	0,5 M
Tris-HCl pH 9,7	250 mM
NaOH 20% zur Einstellung auf pH 9,7	

α-Isonitrosopropiophenon:

ISPF 9% in Ethanol (w/w)

MnCl₂-Lösung ph 7,4

MnCl ₂	5 mM
Tris-HCl	25 mM

NaOH 20% zur Einstellung auf pH 7,4

Säuremix

konz. H ₂ SO ₄	1 Teil
H ₃ PO ₄ 85%	3 Teile
Aqua bidest.	7 Teile

Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren

0,1% Triton-Lösung	
EDTA pH 8	2 mM
Leupeptin	1 µM
Pepstatin A	1 µM
PMSF	1 mM

Triton-Tris-Mn-Lösung

1T Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren
1T Manganchlorid-Lösung pH 7,4

Lösung für die Nitrit-Bestimmung

Griess-Reagenz

Sulfanilamid	1% (w/v)
N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin Dihydrochlorid	0,1% (w/v)
2,5% H ₃ PO ₄ -Lösung	

1 M NaNO₂-Standardlösung (Ansatz: 1 ml)

NaNO ₂	1 M
bidest. Wasser	

2,5% H₃PO₄-Lösung

85% H ₃ PO ₄	2,5% (w/v)
bidest. Wasser	

Lösung für die Protein-Bestimmung nach LowryBSA-Standardlösung

BSA 4 mg/ml

0,1% Tris-Triton-Lösung

Reagenz-A

Reagenz S 1% (v/v)

Reagenz A 99% (v/v)

1% Tris-Triton-Lösung

1 M Tris-HCl-Lösung pH 7,4 100 mM

Triton x-100 1% (v/v)

Aqua bidest.

Lösungen für die RNA-Präparation, RT-PCR und Gelelektrophorese:Zellyse und RNA-Präparation:DEPC-Wasser

DEPC 0,2% (v/v)

Aqua bidest.

RT-Master-Mix

Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Probe (8 µl), der Master-Mix wird dann entsprechend für (n+1) Proben angesetzt:

10x RT-Puffer 2 µl

5 mM dNTP-Mix 2 µl

10 U/µl RNase Inhibitor RNasin Plus
(1:4 verdünnt mit 1x RT-Puffer)

1 µl

10 µM Oligo(dt)₁₈-Primer 2 µl

Omniscript Reverse Transkriptase 1 µl

PCR-Master-Mix

Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Probe (45 µl), der Master-Mix wird dann entsprechend für (n+1) Proben angesetzt:

10x PCR-Puffer	5,0 µl
50 mM MgCl ₂	1,5 µl
10 mM dNTP-Mix	1,0 µl
5 U/µl Taq Polymerase	0,5 µl
10 µM sense-Primer	2,5 µl
10 µM antisense-Primer	2,5 µl
Aqua bidest. Ad 45 µl	

Gelelektrophorese:5x TBE-Puffer

Tris	0,45 M
Borsäure	0,44 M
EDTA	0,012 M
Aqua bidest.	

0,5x TBE-Puffer

5x TBE-Puffer 1:10 verdünnt mit Aqua bidest.

Agarose-Gel 1,2%

Agarose	1,2%
0,5x TBE-Puffer	
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	10µl

Ethidiumbromid-Lösung 1%

Ethidiumbromid	1%
Aqua bidest.	

Probenpuffer

Ficoll 400	15% (w/v)
Bromphenol-Lösung 1%	0,25% (w/v)
5x TBE-Puffer	0,5x
Aqua bidest.	

3. Primer

β -Aktin: sense: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'
anti-sense: 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'

Arginase I sense: 5'-AAAGCCCATAGAGATTATCGGAGCG-3'
anti-sense: 5'-AGACAAGGTCAACGGCACTGCC-3'

iNOS sense: 5'-CATGAACTCCAAGAGTTTGACCAG-3'
anti-sense: 5'-GCCCAGGTCGATGCACAACACTGG-3'

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

4. Testsubstanzen

Anacardic Acid (AA) = 6-Pentadecylsalicylic acid	Axxora, Lörrach
Stocklösung: 1 mM in DMSO	
Verdünnung: Aqua bidest.	
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
Stocklösung: 100 mM in Ethanol abs.	
Verdünnung: 1xPBS	
Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	Sigma-Aldrich, München
Stocklösung: 10 µg/ml in PBS	
Verdünnung: 1xPBS	
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich, München
Stocklösung: 1 mg/ml in Aqua bidest.	
Verdünnung: 1xPBS	
PDTC	Sigma-Aldrich, München
Stocklösung: 60 mM in Aqua bidest.	
Verdünnung: Aqua bidest.	
TLCK	Sigma-Aldrich, München
Stocklösung: 10 mM in Aqua bidest.	
Verdünnung: Aqua bidest.	

5. Arbeitsmaterial und Geräte

Analysenwaage 2444, 2258

Autoclav 80230

Brutschränke: Incubator Infrared CO₂
Steri-Cycle CO₂ Incubator

Fotodokumentationssystem Power Shot G5

Mikroskop IMT2-RFL

Halbmikro-Küvetten 10 x 4 x 45 mm

Heizblöcke und Thermocycler:

PCR Thermal Reactor

MyCycler

pH-Elektrode SenTix 81

pH-Meter inoLab 1

Sicherheitswerkbänke LaminAir HB HBB 2436

Zellkulturplatten/-schalen versch. Größen

Zentrifugen: 54115 C, 5804R Kühlzentrifuge
Labofuge GL, Biofuge pico
Mini-Zentrifuge MCF 2360

Sartorius, Göttingen

Webeco, Bad Schwartzenau

Forma Scientific, Marietta, USA

Thermo Electron, Dreieich

Canon, Krefeld

Olympus, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

MWG, Ebersberg

BioRad, München

WTW GmbH, Weilheim

WTW GmbH, Weilheim

Holten, Allerød, Dänemark

Nunc, Roskilde, Dänemark

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

LMS, Tokio, Japan

II. METHODEN

1. Präparation und Kultur von Alveolarmakrophagen der Ratte

Zwei bis vier Monate alte Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts, geboren im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn, wurden durch zervikale Dislokation getötet und ausgeblutet. Nach der Öffnung des Thorax wurden Herz und Thymus entfernt und die Lunge samt unterhalb des Larynx durchtrennter Trachea herausgelöst. Zur Zellisolierung wurde eine Lavage der Lungen mit PBS durchgeführt. Hierzu wurde jede Lunge mit Hilfe einer Spritze dreimal mit jeweils 5 – 10 ml 4°C kalter PBS gespült. Zur Verbesserung der Zellablösung wurden während des Absaugens der Lavage die Lungenflügel sanft massiert.

Für einen Präparationsansatz wurden im Durchschnitt vier bis fünf Rattenlungen lavagiert. Die Lavage wurde in sterile Kunststoffröhrchen überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sterilen Bedingungen dekantiert. Die Zell-Pellets wurden mit 6 ml PBS resuspendiert und in einem Röhrchen zu einem Pool vereinigt. Mit weiteren 6 ml PBS wurden die verwendeten Kunststoffröhrchen nachgespült, um möglichst alle Zellen zu erfassen. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 400 g für 5 min. Der Überstand wurde wiederum unter sterilen Bedingungen verworfen. Das Pellet wurde jetzt in 2-4 ml Makrophagen-Kulturmedium resuspendiert.

Nun wurde die Anzahl der präparierten Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bei gleichzeitiger Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt. Hierzu wurden 80 µl Trypanblau-Färbelösung mit 20 µl Zellsuspension versetzt. Die Kammer wurde mit einem Teilvolumen dieser Suspension beschickt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Mit Hilfe des Kammerfaktors konnte rechnerisch die in den 2-4 ml Zellsuspension vorhandene Zellzahl ermittelt werden.

Die Zellen wurden auf 12-Loch-Kulturschalen so ausgesät, dass pro Vertiefung eine Zellzahl von einer Million erreicht wurde. Es wurden jeweils 500 µl Kulturmedium hinzugefügt. Zur Adhärenz wurden die Zellen für mind. 2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel. Das Medium wurde möglichst vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, um adhärenente Zellen nicht abzulösen. Nicht adhärenente Zellen sowie mitpräparierte Erythrozyten wurden entfernt. Schließlich wurde frisches Medium zugesetzt.

2. Enzym-Assays

2.1. Spektralphotometrische Bestimmung von Nitrit

Protokoll nach Schmidt et al. (1988)

RAM wurden wie unter II.1. beschrieben präpariert und kultiviert. Nach zweistündiger Adhäsionsphase und erfolgtem Mediumwechsel wurden nun je nach Versuchsprotokoll Testsubstanzen zugesetzt, wobei sich die Volumina von Testsubstanz und zugesetztem Medium jeweils zu 500 µl Gesamtvolumen pro Vertiefung ergänzten. Die Zellen wurden für weitere 20 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Zur Bestimmung der iNOS-Aktivität wurde die nach dieser Inkubationszeit im Medium vorhandene Nitrit-Konzentration spektralphotometrisch, basierend auf der Griess-Reaktion, bestimmt. Hierzu wurden 400 µl Kulturüberstand in Halbmikroküvetten überführt. Mit einer Multipipette wurden 400 µl frisch hergestelltes Griess-Reagenz zugesetzt. Nach 20-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion des gebildeten Azofarbstoffes gegen einen Leerwert, bestehend aus 400 µl Makrophagen-Primärmedium / 0,1% Triton x 100 + PI und 400 µl Griess-Reagenz, bei einer Wellenlänge von 540 nm spektralphotometrisch gemessen.

Zur Ermittlung der Nitrit-Konzentration in den Proben diente eine NaNO₂-Regressionsgerade. Die Standards zur Erstellung der Geraden enthielten NaNO₂ in Konzentrationen von 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 und 80 µM in Makrophagen-Kulturmedium / 0,1% Triton x-100 + PI.

In Analogie zu den Proben wurden zu je 400 µl dieser Standards 400 µl Griess-Reagenz gegeben und nach 20 min Inkubationszeit vermessen.

2.2. Arginase-Assay

Harnstoff-Bestimmung nach Corraliza et al. (1994)

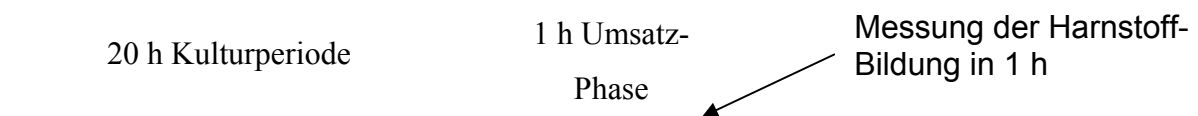
Für den Arginase-Assay wurden die bereits unter II.2.1. beschriebenen Versuchsansätze mit je 1 Mio. RAM auf 12-Loch-Kulturschalen weiterbearbeitet; demzufolge wurden Nitrit-Bestimmung und Arginase-Assay grundsätzlich parallel durchgeführt. Nach Abnahme der Kulturüberstände für die Nitrit-Bestimmung wurden die adhären Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in je 750 µl Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren inkubiert. 50 µl des erhaltenen Zell-Lysats wurden für die Protein-Bestimmung (s. II.3.) eingesetzt, wohingegen 500 µl in ein Glasröhrchen überführt, im Verhältnis 1:1 mit 25 mM Tris-HCl / 5 mM MnCl₂-Lösung pH 7,4 gemischt und im Wasserbad für 10 min bei 56°C inkubiert wurden. Anschlie-

ßend wurden 50 µl dieses Lysat-Tris / Mn-Gemischs in ein Kunststoffröhrchen pipettiert, mit 50 µl 0,5 M L-Arginin-Lösung pH 9,7 versetzt und einer einstündigen Umsatzphase bei 37°C unterzogen. Während dieser Inkubationszeit wurde eine 0,5 µg µl⁻¹ Harnstoff-Standardlösung hergestellt, die neben einer 25 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,7 und einer Triton-Tris-Mn-Lösung zur Erstellung einer Eichgeraden mit absoluten Harnstoff-Mengen von 1, 2, 5, 10, 15, 20 und 25 µg in Endvolumina von je 100 µl diente. Die Zusammensetzung der Eichwerte war so gewählt, dass der Gehalt an vorstehend genannten Lösungen dem der Proben entsprach; als Leerwert diente eine Mischung von 50 µl 25 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,7 mit 50 µl Triton-Tris-Mn-Lösung. Nach Verstreichen der einstündigen Umsatzzeit wurden mit Hilfe einer Multipipette sowohl zu den Proben als auch zu den frisch hergestellten Standards und dem Leerwert je 800 µl Säuremix und je 50 µl 9% ISPF-Lösung pipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wurden alle Kunststoffröhrchen für 45 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Der durch Reaktion von ISPF mit dem während der Umsatzphase in den Proben bzw. in den Standards gebildete Farbstoff wurde gegen den Leerwert bei 540 nm spektralphotometrisch vermessen und der Harnstoff-Gehalt der Proben mit Hilfe einer Regressionsgeraden bestimmt. Bei der Umrechnung des Harnstoff-Gehaltes in Arginase-Einheiten ist eine Einheit [Unit, U] definiert als diejenige Enzymmenge, welche die Entstehung von 1 µmol Harnstoff pro Minute bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 9,5 katalysiert (Corraliza et al., 1995; Jenkinson et al., 1996). Entscheidend für die Beurteilung der mit Hilfe der Enzym-Assays erhaltenen Ergebnisse ist die Berücksichtigung der unterschiedlichen Versuchsabläufe (Abb. 3). Während die durch die Nitrit-Bestimmung gewonnenen Werte die Akkumulation von Nitrit und dementsprechend die iNOS-Aktivität über die gesamte 20-stündige Kulturperiode reflektieren, liefert der Arginase-Assay eine Momentaufnahme der Arginase-Aktivität nach Abschluss der Kulturphase und ohne Konkurrenz durch die iNOS.

1. iNOS



2. Arginase



Schema des Versuchsablaufs der Enzym-Assays

3. Protein-Bestimmung

Protokoll nach Firmenangaben zum D_C Protein Assay Kit (Bio-Rad)

Wie bereits in C. II. 2. 2. erwähnt, wurden 50 µl des Zell-Lysates aus dem Arginase-Assay einer Protein-Bestimmung unterzogen. Mit Hilfe einer Multipipette wurden zunächst 100 µl frisch hergestelltes Reagenz A* und unmittelbar danach 800 µl Reagenz B hinzugefügt, gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend wurde mit je 50 µl Standards aus Rinder-Serumalbumin verfahren, die, gelöst in 0,1% Tris-Triton-Lösung, in den Konzentrationen 50, 100, 300, 700, 1100 und 1500 µg ml⁻¹ zum regelmäßigen Einsatz in der Protein-Bestimmung bei -20°C gelagert wurden. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Absorption von Proben und Standards gegen identisch vorbereitete Leerwerte entsprechender Zusammensetzung, d.h. für Proben aus dem Arginase-Assay 50 µl Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren, für Proben aus der Protein-Präparation aus RAM 50 µl 0,1% Tris-Triton-Lösung mit 10% Nonidet P40-Puffer mit Protease-Inhibitoren, und für Standards 50 µl 0,1% Tris-Triton-Lösung, bei 750 nm an einem Spektralphotometer vermessen. Dabei hatte die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel für Standards und Proben keinerlei Einfluß auf die erhaltenen Ergebnisse.

4. RNA-Präparation

Nach der unter II.1 beschriebenen Präparation von RAM wurden je 5 Mio. Zellen auf Kulturschalen in 1 ml Makrophagen-Medium ausgesät. Im Anschluss an die zweistündige Adhäsionsphase wurden die Zellen dann für 5, 10 oder 20 h in An- oder Abwesenheit verschiedener Testsubstanzen kultiviert (37°C und 5% CO₂). Nach Absaugen des Kulturmediums wurde 1,5 ml Lysis-Puffer auf die Platten gegeben, welche dann 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen wurden. Das Zellmaterial wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden gelöst und schließlich in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Reaktionsgefäße konnten nun gegebenenfalls bei -80°C gelagert oder direkt weiterbearbeitet werden.

5. RNA-Konzentrationsbestimmung

RNA hat ein Absorptionsmaximum bei 320 nm, dieses Absorptionsmaximum kann zur photometrischen Konzentrationsbestimmung mittels UV-Licht genutzt werden. Dabei besteht eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl gelöster Stoffe und der Menge absorbierten UV-

Lichts. Die Schwächung eines Lichtstrahls durch Absorption (=Extinktion) entspricht dem Produkt aus Schichtdicke (d) der Lösung, Extinktionskoeffizient (e) und Konzentration (C) der gelösten Substanz. Diesen Zusammenhang beschreibt das Lambert-Beer-Gesetz:

$$E = d \cdot e \cdot C.$$

Durch einfaches Umstellen der Gleichung kann nun die Konzentration der RNA bestimmt werden.

$$C = E / (d \cdot e)$$

Zur Durchführung der Konzentrationsbestimmung wurden 2µl der RNA-Probe mit 78µl Wasser in einem Mischverhältnis von 1:40 verdünnt.

Die Probe wurde in eine Quarzküvette pipettiert und bei 320 nm im GeneQuant Photometer gemessen.

Das Gerät ermittelt anhand der oben stehenden Formel neben der Absorption sofort die Konzentration der RNA in der Probe und deren Ratio, also den Quotienten aus der Absorption bei 280 nm und der Absorption bei 320 nm. Die Ratio ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte etwa 1,6 betragen.

6. Reverse Transkription (RT-Reaktion)

Bei der reversen Transkription wird RNA mit Hilfe des viralen Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-gesteuerte DNA-Polymerase von Retroviren, die ein RNA-Genom besitzen. In vitro kann mit der reversen Transkriptase cDNA aus beliebiger RNA hergestellt werden.

Da RNA im Gegensatz zu DNA sehr leicht durch lytische Enzyme zerstört werden kann, ist bei der Reversen Transkription auf besondere Sorgfalt zu achten. Die RT wurde unter der sterilen Werkbank unter Verwendung mit Watte gestopfter Pipettenspitzen durchgeführt. Zusätzlich wurden sämtliche RNA-enthaltenden Gefäße immer auf Eis gestellt.

Aus den am Photometer gewonnenen Angaben über die Konzentration der RNA (s. II.5) ließ sich die Gesamtmenge der RNA in 80 µl errechnen sowie die Flüssigkeitsmenge, die 1 µg RNA enthält. Diese Menge wurde in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der RT-Mastermix hergestellt und 7,5 µl zu jedem Ansatz gegeben, sodass ein Endvolumen von 20 µl resultierte.

Dieses Gemisch wurde zunächst 60 min bei 37°C inkubiert (RT-Reaktion) und anschließend weitere 5 min bei 93°C um die Reverse Transkriptase zu deaktivieren. Danach wurde kurz

zentrifugiert, und jede Probe mit 80 µl DEPC-Wasser aufgefüllt. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

7. PCR-Reaktion und anschließende Gelelektrophorese

7.1 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Hierbei macht man sich die Fähigkeit des Enzyms DNA-Polymerase zu Nutze. In vivo ist dieses Enzym während der Zellteilung hauptverantwortlich für die semikonservative Replikation der DNA, da sie die komplementären Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an der in zwei Einzelstränge gespaltenen DNA neu verknüpft.

Die DNA-Polymerase kann jedoch nicht de novo die Synthese beginnen. Sie benötigt dazu ein freies 3'-OH-Ende eines Starter-Oligonukleotids (Primer), welches mit dem komplementären DNA-Einzelstrang bereits einen partiellen Doppelstrang ausgebildet hat. Es müssen daher bei jeder PCR pro zu amplifizierender Sequenz zwei verschiedene Primer mit gegenseitiger Orientierung verwendet werden. Mit diesen Primern kann ein beliebiges Stück der DNA ausgewählt und vervielfältigt werden.

Das Prinzip der PCR besteht in dem mehrfachen Durchlaufen eines Reaktionszyklus. Während jedes Zyklus wird an jedem vorhandenen DNA-Einzelstrang ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dadurch ist theoretisch eine exponentielle Vervielfältigung des gesuchten DNA-Abschnitts möglich.

Ein Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten:

Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird ein Gemisch aus DNA, dNTPs, zweier sequenzspezifischer Primer und einer DNA-Polymerase in einem Reaktionspuffer auf 95° Celsius erhitzt und eine Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in seine Einzelstränge erreicht. Schnelles Abkühlen der Reaktionstemperatur verhindert die Reassoziierung der beiden Einzelstränge. Im nächsten Schritt, der Anlagerung (Annealing), kommt es bei einer Temperatur von 56° Celsius zu einer Anlagerung der Primer an die beiden Einzelstränge, wobei diese so gewählt sind, dass sich der eine am Anfang und der andere am Ende der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz anlagert.

Im letzten Schritt, der Komplementärstrangsynthese (Extension), erfolgt bei einer Temperatur von 72° Celsius mit Hilfe der DNA-Polymerase die Neusynthese einer Doppelstrang-DNA ausgehend von den zuvor angelagerten Primern, die im nächsten Zyklus wiederum als Template für Denaturierung, Annealing und Neusynthese dienen kann.

Normale DNA-Polymerasen, die eine Eiweißstruktur haben, würden bei diesem Vorgang hitzebedingt denaturieren, daher verwendet man für die PCR als Enzym der Wahl die hitzebeständige Taq-Polymerase, (aus *Thermophilus aquaticus*), welche die initiale Denaturierungstemperatur von 95°C übersteht und daher eine Automatisierung der PCR und eine große Anzahl von PCR-Zyklen hintereinander ermöglicht.

Je 5 µl des cDNA-Pools wurden zu 45 µl des unter I.1.3 beschriebenen Mastermixes pipettiert.

Die Reagenzien, vor allen Dingen die taq-Polymerase, waren stets auf Eis gelagert. Sämtliche Pipettierschritte wurden unter der sterilen Werkbank mittels autoklavierter Pipettenspitzen durchgeführt.

Im Robocycler konnte ein individueller PCR-Ablauf programmiert werden, wobei in der Regel die nachfolgenden Temperaturen und Zeiten eingehalten wurden.

<u>Funktion</u>	<u>Temperatur [°C]</u>	<u>Dauer</u>
Denaturierung	94	Initial 3 min
	94	je 45 s
Annealing	56	je 30 s
Extension	72	je 60 s
		abschließend 10 min

Die Anzahl der durchgeführten Zyklen betrug für die β-Aktin-Primerpaare stets 23, für die Arginase I-Primerpaare 25 und für die iNOS-Primerpaare 30.

7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde 1,8 g Agarose in 150 ml 0,5x TBE-Puffer eingewogen und aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Dann erfolgte die Abkühlung des Gels unter kontinuierlichem Rühren. Nach Abkühlen auf ungefähr 50°C wurden 5 µl 1% Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt.

Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender interkalierender Farbstoff, der sich etwa alle 4-5 Nukleotide zwischen den Strangwindungen doppelsträngiger DNA einlagert. Die DNA kann auf diese Weise unter UV-Licht nachgewiesen werden.

Anschließend wurde das Gel blasenfrei in einen Gelträger gegossen. Mit Gelkämmen wurden Taschen im Gel ausgespart, in welche die DNA-Proben aufgetragen wurden.

Die Elektrophorese ist der Transport geladener Partikel durch elektrischen Strom (Gleichstrom). Durch den Molekularsiebeffekt der Agarose kommt es zu einer Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren nach Größe bei ihrer Wanderung zur Anode.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel in die Pufferkammer eingelegt und vollständig mit Laufpuffer (0,5x TBE-Puffer) bedeckt. 20 µl der PCR-Proben wurden zunächst in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2 µl Blau-Marker vermischt. Von diesen 22 µl wurden dann 20 µl vorsichtig in die Taschen (Slots) des Gels pipettiert.

Als Positivprobe und um die Größe der amplifizierten DNA-Stücke zu überprüfen wurde ein Marker (SmartLadder) mit einer definierten Anzahl von Basenpaaren aufgetragen.

Bei konstanter Stromstärke von 50-70 mA und einer Spannung von etwa 220 Volt wurde die Gelelektrophorese so lange durchgeführt, bis der Farbmarker die Unterkante des Gels erreichte (ca. 2,5h); bei einer Elektrophorese über Nacht wurde eine Stromstärke von 8 mA eingestellt.

Das fertige Gel wurde auf dem Beleuchtungstisch unter UV-Licht betrachtet. Anschließend wurde mittels Digitalkamera ein Photo erstellt und abgespeichert, das der densitometrischen Auswertung der Banden diente. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm RFLPscan. Hierbei wurden Quotienten anhand der optischen Dichten der Probenbande und der Kontrollbande des β -Actin gebildet.

8. Statistik und Berechnung

Microsoft Excel 2003

Sämtliche Auswertungen der Versuchsergebnisse wurden mit diesen Programmen unter Erstellung von Tabellen der Einzelergebnisse und deren Verwendung für Mittelwertstabellen durchgeführt. Auch die Erstellung von Eichgeraden erfolgte mit Excel 2003.

GraphPad Prism 5.0

Dieses Programm wurde verwendet, um die Versuchsergebnisse, die immer den arithmetischen Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Versuchsreihen zeigen, graphisch darzustellen.

GraphPad Instat

Hiermit wurden signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten berechnet. Verglichen miteinander wurden entweder Absolutwerte oder Prozentwerte des Mittelwertes der Kontrollgruppe einer jeden Zellpräparation. Der Vergleich zweier Messreihen erfolgte durch den zweiseitigen Student t-Test. Statistische Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit $P < 0,05$ galten als signifikant.

RFLPscan 2.01

Dieses Programm der Firma MWG Biotech wurde zur semiquantitativen Berechnung der optischen Dichten der PCR-Banden auf den Agarose-Gelen verwendet.

D. ERGEBNISSE

I. Funktionelle Untersuchungen der Arginase und iNOS

1. Aktivität der Arginase und iNOS unter der Wirkung von LPS

1.1. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von LPS

RAM, gewonnen aus der Bronchiallavage von 4 bis 5 Ratten, wurden für 20 Stunden in Gegenwart von LPS in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml kultiviert. Anschließend wurde ein Arginase-Assay durchgeführt. Der hierbei entstandene Harnstoff wurde mittels einer Farbreaktion quantifiziert und zur Bestimmung der Aktivität der Arginase herangezogen.

Nach der einstündigen Inkubation in Gegenwart von 0,5 M L-Arginin zeigte sich unter Kontrollbedingungen eine basale Arginase-Aktivität von 196 ± 27 mU/ μ g Protein. Wie in Abb. 1 zu sehen, führte die Inkubation mit LPS zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Arginase-Aktivität auf bis zu 220% des Basalwertes (100 ng/ml LPS).

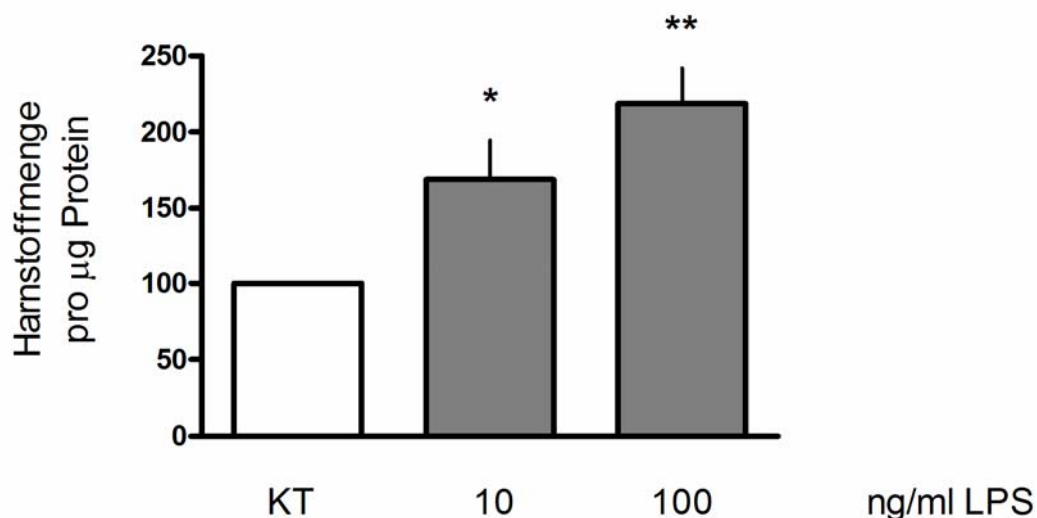


Abb.1: Wirkung von LPS auf die Arginase-Aktivität in RAM nach 20stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in Harnstoffmenge pro μ g Protein als %-Wert der Kontrolle von 7 (LPS 10 ng/ml) bzw. 6 (LPS 100 ng/ml) Experimenten. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

1.2. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von LPS

Zur Bestimmung der iNOS-Aktivität wurde nach der 20-stündigen Kulturphase im Überstand des Kulturmediums die Nitrit-Akkumulation gemessen. Die Bildung von Nitrit dient dabei als Maß für die Aktivität der iNOS, da das bei der Enzym-Reaktion gebildete NO rasch zu den stabilen inaktiven Endprodukten Nitrit bzw. Nitrat weiteroxidiert wird. Bereits unter Kontrollbedingungen wurde eine basale Nitrit-Konzentration gemessen, die um einen Mittelwert von ca. 8000 nM/ml Medium schwankt. Die Anwesenheit von LPS verursachte eine starke Zunahme der NO-Synthese auf das zehnfache des Ausgangswertes (siehe Abb. 2)

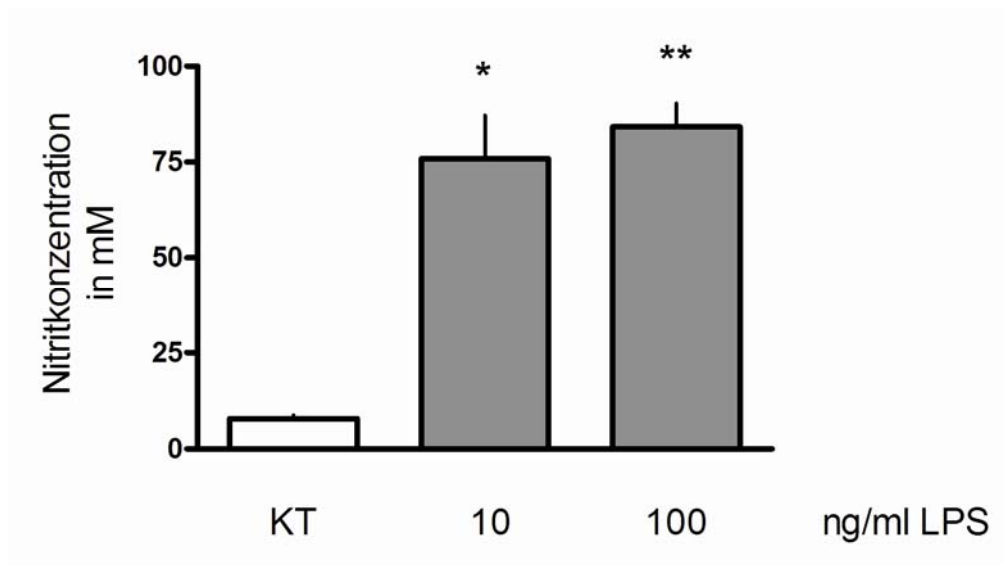


Abb.2: Wirkung von LPS auf die iNOS-Aktivität in RAM nach 20-stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in Nitritkonzentration in mM ($n = 6$ bzw. 8). * $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,0005$ im Vergleich zur Kontrolle.

2. Aktivität der Arginase und iNOS unter der Wirkung von GM-CSF

Nach dem Standardprotokoll wurden RAM für 20 Stunden in Gegenwart von 1, 10, und 100 ng/ml GM-CSF kultiviert und anschließend entweder der Überstand oder die Zellysate für die entsprechenden Enzym-Assays herangezogen.

2.1. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF

Die 20-stündige Inkubation mit GM-CSF führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Arginase-Aktivität bis auf einen Höchstwert von 382 mU/μg Protein bei 100 ng/ml GM-CSF, was einer Verdopplung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle entspricht (siehe Abb. 3). Damit fällt der GM-CSF-Effekt geringfügig schwächer aus als der Effekt von LPS in der Konzentration von 100 ng/ml.

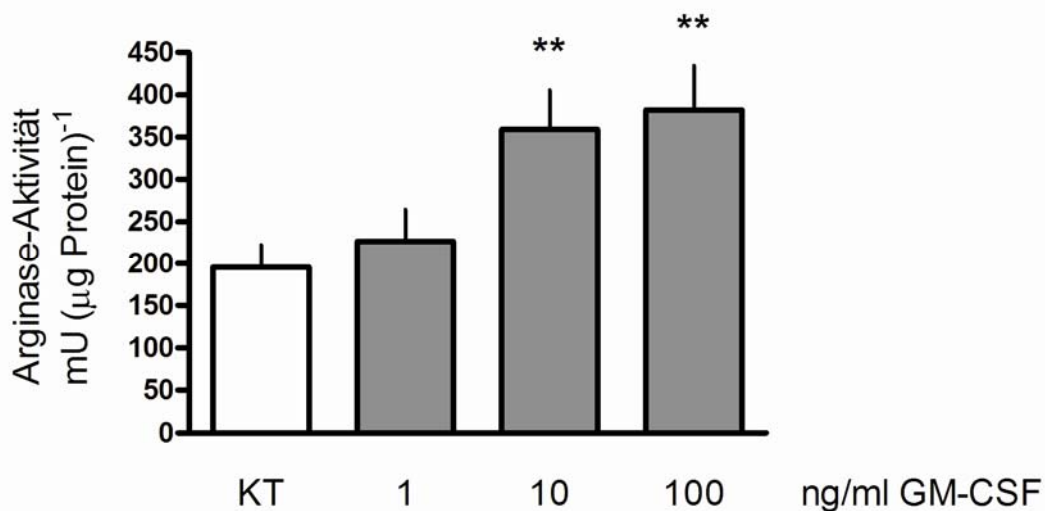


Abb.3: Wirkung von GM-CSF (1, 10, 100 ng/ml) auf die Arginase Aktivität in RAM nach 20-stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in mU pro μg Protein von jeweils 6 Experimenten. ** P < 0,005 im Vergleich zur Kontrolle.

2.2. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF

Die Messung der Nitrit-Konzentration im Überstand des Kulturmediums ergab bereits in der Konzentration von 1 ng/ml GM-CSF einen statistisch signifikanten Anstieg der iNOS-Aktivität, die bei 100 ng/ml GM-CSF 226% des Kontrollniveaus erreichte (siehe Abb. 4).

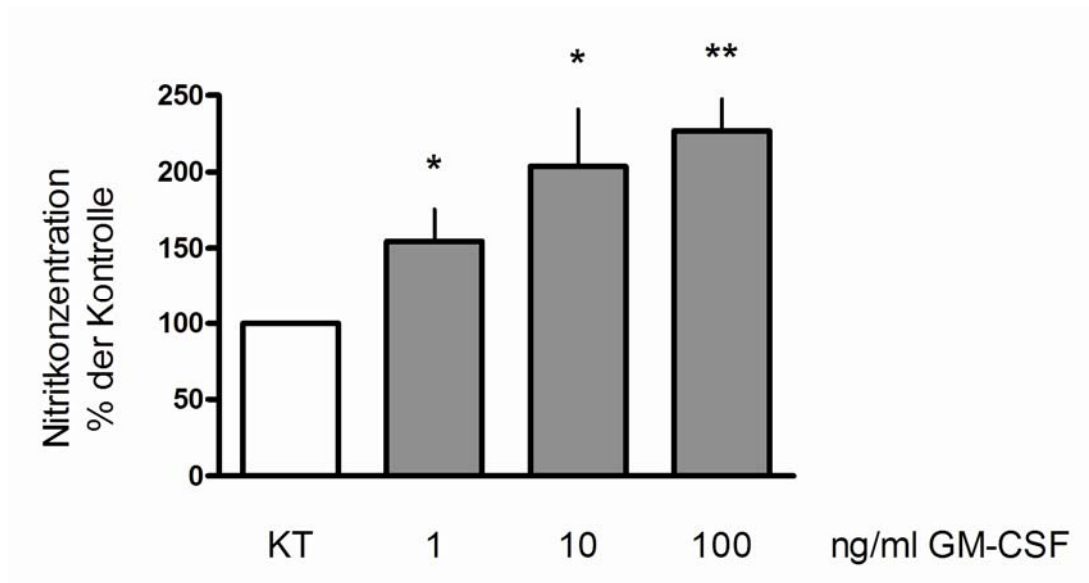


Abb.4: Wirkung von GM-CSF auf die iNOS-Aktivität in RAM nach 20-stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM der Nitritkonzentration als % der Kontrolle (n=6).

* $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

3. LPS- bzw. GM-CSF-Effekte in Kombination mit Dexamethason

3.1. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und LPS

Wiederum wurden RAM über 20 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von LPS (100 ng/ml) kultiviert. Zusätzlich wurde der Effekt von Dexamethason (100 nM) sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch in Kombination mit LPS untersucht. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, zeigte sich, dass Dexamethason den LPS-Effekt vollständig aufhebt.

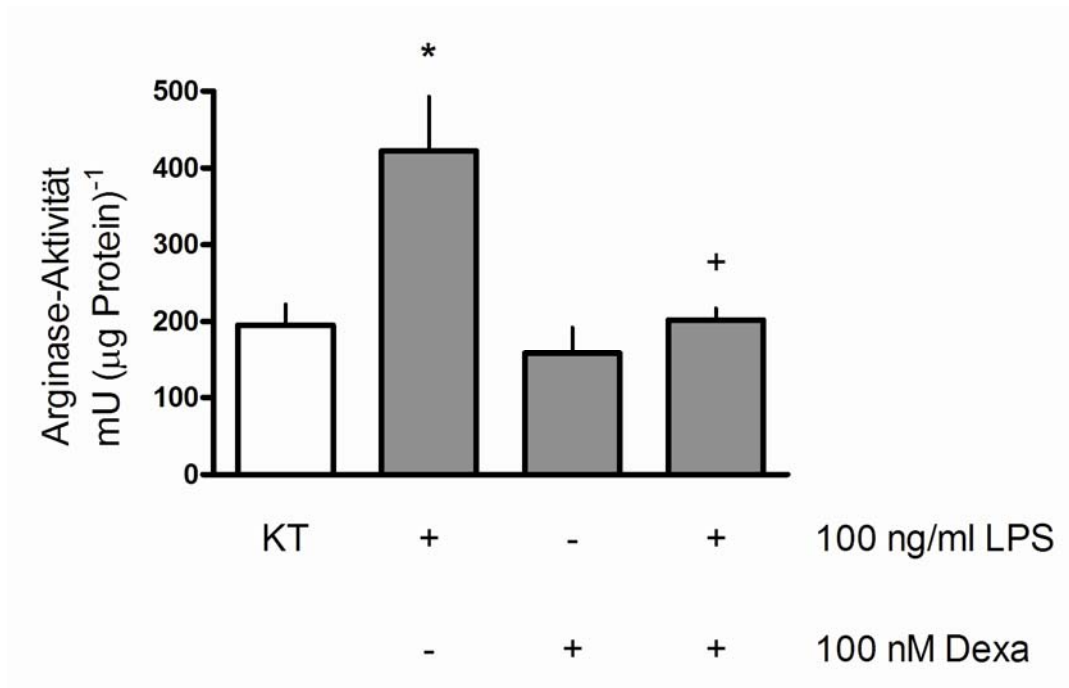


Abb.5: Hemmender Einfluss von Dexamethason auf die Arginase-Aktivität in RAM in An- bzw. Abwesenheit von LPS nach 20-stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in mU pro µg Protein von jeweils 6 Experimenten. * $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. + $P < 0,05$ im Vergleich zu LPS alleine.

3.2. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und LPS

Auch auf die LPS-induzierte Zunahme der Aktivität der iNOS wirkt Dexamethason dämpfend, wenn gleich der Effekt weit weniger stark ausgeprägt zu sein scheint, als bei der Arginase. Dennoch ist die Nitrit-Akkumulation in Gegenwart des Glukokortikoids statistisch signifikant gesenkt (siehe Abb. 6).

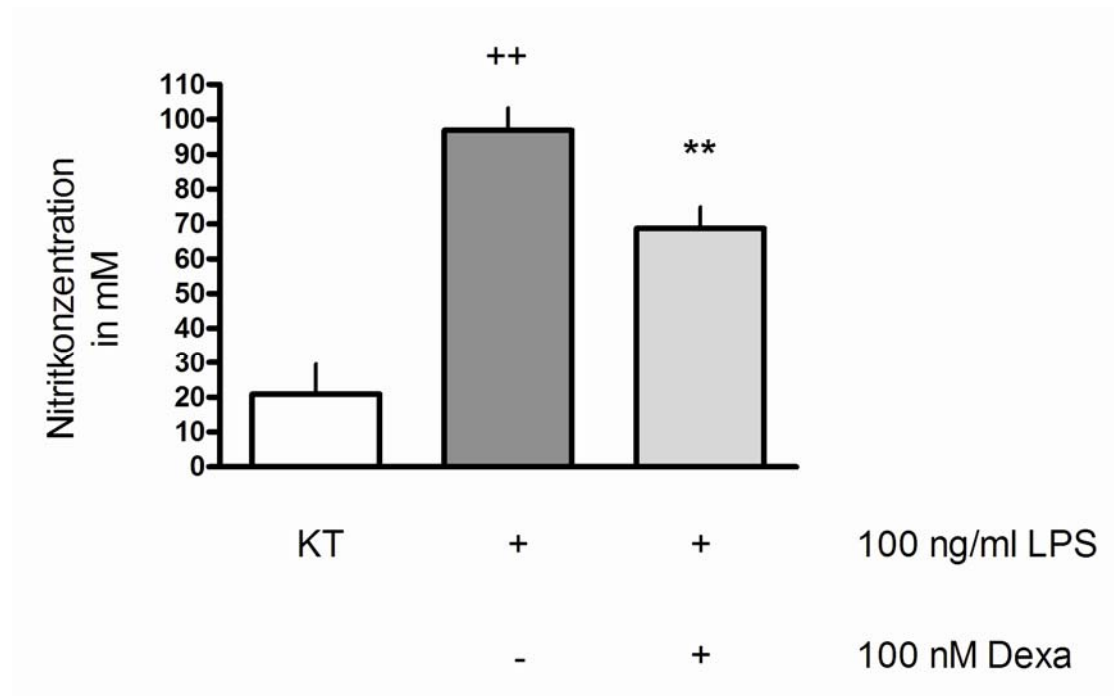


Abb.6: Hemmender Einfluss von Dexamethason auf die LPS-induzierte iNOS-Aktivität in RAM nach 20-stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM der Nitritkonzentration in mM von 6 unabhängigen Versuchen. ++ $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,0005$ im Vergleich zu Inkubation mit LPS alleine.

3.3. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und GM-CSF

RAM wurden über 20 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von GM-CSF in den Konzentrationen 1, 10 und 100 ng/ml sowie mit bzw. ohne Dexamethason (100 nM) inkubiert. In den folgenden Arginase-Assays zeigte sich eine deutliche Inhibition des GM-CSF-Effektes in allen drei Konzentrationen bis auf Werte knapp über dem Kontrollniveau, vergleichbar mit der Dexamethason-Wirkung auf die LPS-induzierte Arginase-Aktivität.

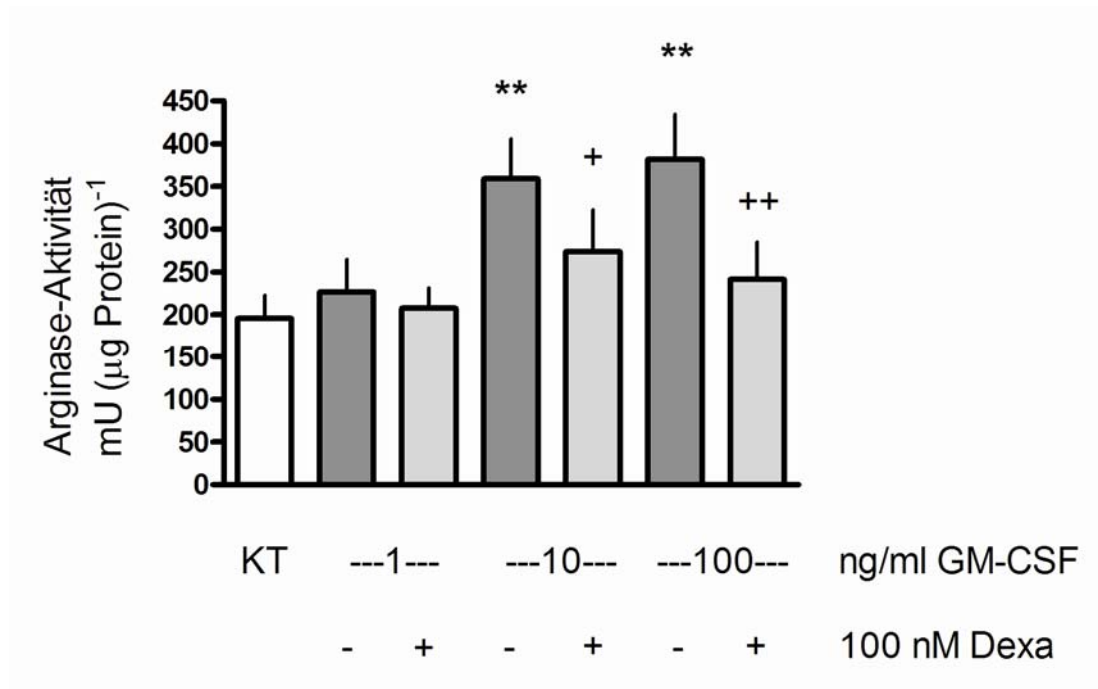


Abb.7: GM-CSF-Effekt auf die Arginase-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in mU pro µg Protein von jeweils 6 Experimenten. ** P < 0,005 im Vergleich zur Kontrolle. + P < 0,01 im Vergleich zu GM-CSF alleine. ++ P < 0,005 im Vergleich zu Inkubation mit GM-CSF alleine.

3.4. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und GM-CSF

Wie bereits beschrieben, verursacht GM-CSF einen konzentrationsabhängigen Anstieg der iNOS-Aktivität auf über 200% der Kontrollansätze. Dexamethason vermag diesen GM-CSF-induzierten Anstieg vollständig aufzuheben. Die hemmende Wirkung von Dexamethason fällt hier im Vergleich zur Hemmung des LPS-induzierten Anstiegs deutlich stärker aus.

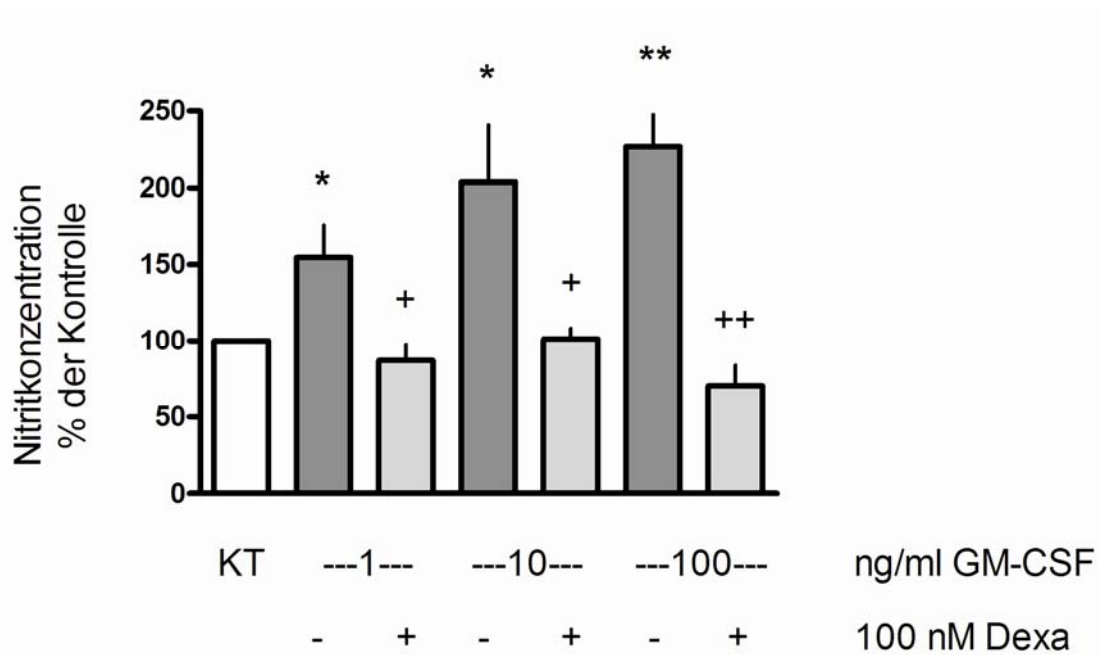


Abb.8: GM-CSF-Effekt auf die iNOS Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in % der Kontrolle von jeweils 6 Experimenten. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle. + $P < 0,05$ im Vergleich zu GM-CSF alleine. ++ $P < 0,005$ im Vergleich zu GM-CSF alleine.

4. GM-CSF-Effekte in Kombination mit NF- κ B-Inhibitoren

In den folgenden Versuchsreihen wurde untersucht, ob die durch GM-CSF induzierte Zunahme sowohl der Arginase I als auch der iNOS auf einer Aktivierung von NF- κ B beruht. Hierzu wurden die Wirkungen der NF- κ B-Inhibitoren Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) und N ^{α} -*p*-Tosyl-L-lysinchloromethylketon (TLCK) auf die Enzymaktivitäten von Arginase I und iNOS getestet. Bei der Substanz PDTC handelt es sich um ein Antioxidans, das die Aktivierung der I- κ B-Kinase hemmt. Dieses Enzym ist für die Phosphorylierung und die damit verbundene reversible Abspaltung der inhibierenden Untereinheit I- κ B verantwortlich, die den im Zytosol vorliegenden Transkriptionsfaktor NF- κ B bindet. TLCK stellt dagegen einen Serin-Protease-Inhibitor dar, der die Degradation der hemmenden Untereinheit über das Proteosom blockiert.

4.1. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von NF- κ B-Inhibitoren und GM-CSF

RAM wurden für 20 Stunden in An- oder Abwesenheit von GM-CSF (100 ng/ml) und PDTC (60 μ M) bzw. TLCK (100 μ M) kultiviert. Im anschließenden Arginase-Assay konnte bei beiden Substanzen ein hemmender Effekt auf die GM-CSF-Wirkung beobachtet werden. Das Ausmaß der Hemmung war dabei für PDTC und TLCK in etwa gleich stark und reduzierte die Arginase-Aktivität auf Werte knapp über dem Kontrollniveau (Abb. 9).

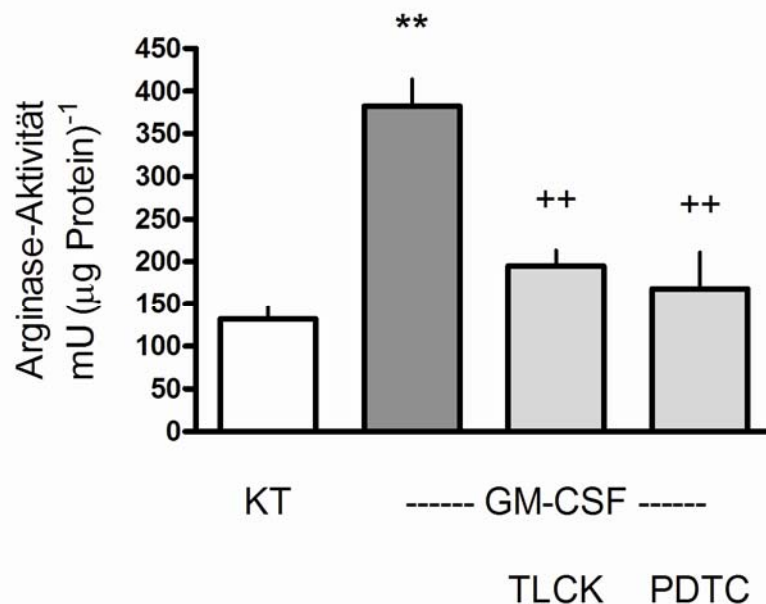


Abb.9: Einfluss der NF- κ B-Inhibitoren TLCK (100 μ M) und PDTC (60 μ M) auf die durch GM-CSF (100 ng/ml) induzierte Zunahme der Arginase Aktivität. Angegeben sind die Mit-

telwerte plus SEM in mU pro μg Protein ($n = 6$). ** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. ++ $P < 0,005$ im Vergleich zu GM-CSF alleine.

4.2. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von NF- κ B-Inhibitoren und GM-CSF

Bei der Bestimmung der Nitrit-Akkumulation im Überstand der Zellkulturen zeigten die beiden NF- κ B-Inhibitoren einen noch ausgeprägteren Effekt. Sie senkten die basale Nitrit-Bildung in nicht stimulierten Zellen auf Werte deutlich unterhalb des Kontrollniveaus. Auch die Nitrit-Akkumulation GM-CSF-stimulierter Zellen ließ sich durch Anwesenheit der NF- κ B-Inhibitoren während der Kulturperiode deutlich unter die Kontrollwerte absenken (sowohl TLCK als auch PDTC ca. 60%).

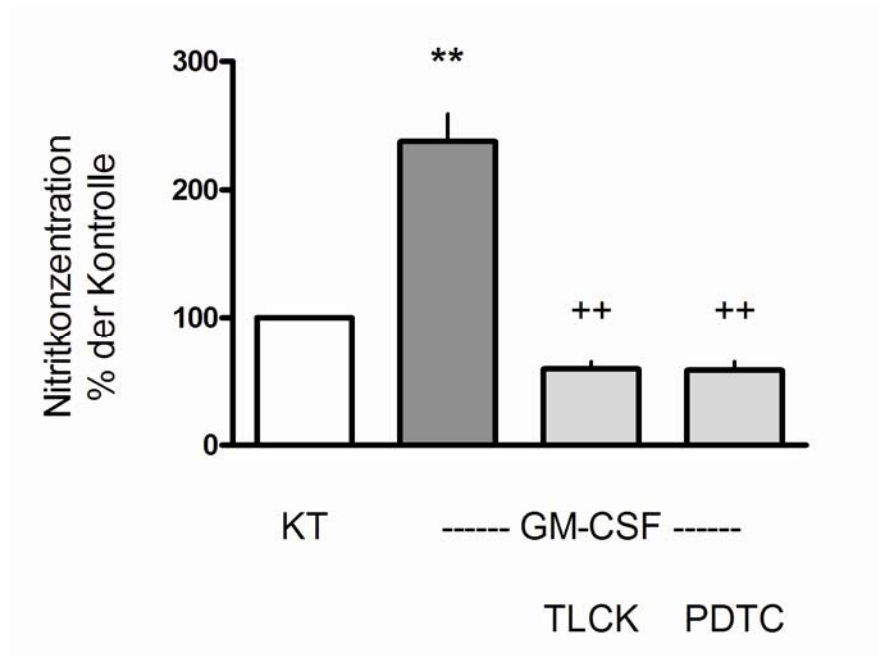


Abb.10: Einfluß der NF κ B-Inhibitoren TLCK (100 μM) und PDTC (60 μM) auf die durch GM-CSF (100 ng/ml) induzierte Zunahme der iNOS-Aktivität. Mittelwerte plus SEM der Nitritkonzentration als % der Kontrolle ($n = 6$). ** $P = 0,0005$ im Vergleich zur Kontrolle. ++ $P < 0,001$ im Vergleich zu GM-CSF alleine.

5. LPS- bzw. GM-CSF-Effekte in Kombination mit Anacardic Acid

Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) sind eine Gruppe von Enzymen, die eine wichtige Rolle in der Organisation des Chromatins und der Regulation der Genexpression spielen. Diese Enzyme modifizieren die N-terminalen Lysinreste von Histonen durch kovalente Bindung von Acetylgruppen aus Acetyl-CoA. Im Rahmen dieser Versuchsreihen wurde untersucht, welche Rolle Histon-Acetylierung in der Steuerung der Transkription der Gene für Arginase I und iNOS spielt. Dazu wurde Anacardic Acid (AA) als ein wirkungsvoller Inhibitor der HAT-Aktivität von p300 und p300/CBP-associated factor (Balasubramanyam et al., 2003) in Kombination mit LPS bzw. GM-CSF eingesetzt.

5.1. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von LPS und AA

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Effekt von Anarcadic Acid auf die LPS-induzierte Zunahme der Arginase-Aktivität untersucht. Hierzu wurden Arginase-Assays durchgeführt, wobei RAM wiederum für 20 Stunden in An- oder Abwesenheit von LPS (10 ng/ml) und AA in den Konzentrationen 1, 10 und 30 μ M kultiviert wurden. Während sich in den niedrigen AA-Konzentrationen allenfalls tendenziell sinkende Aktivitätswerte messen ließen, wurde der LPS-Effekt durch 30 μ M AA statistisch signifikant gesenkt (siehe Abb. 11).

Eine identische Versuchsanordnung mit 100 ng/ml LPS ergab ebenfalls eine hemmende Wirkung durch AA in der Konzentration von 30 μ M (Abb. 12).

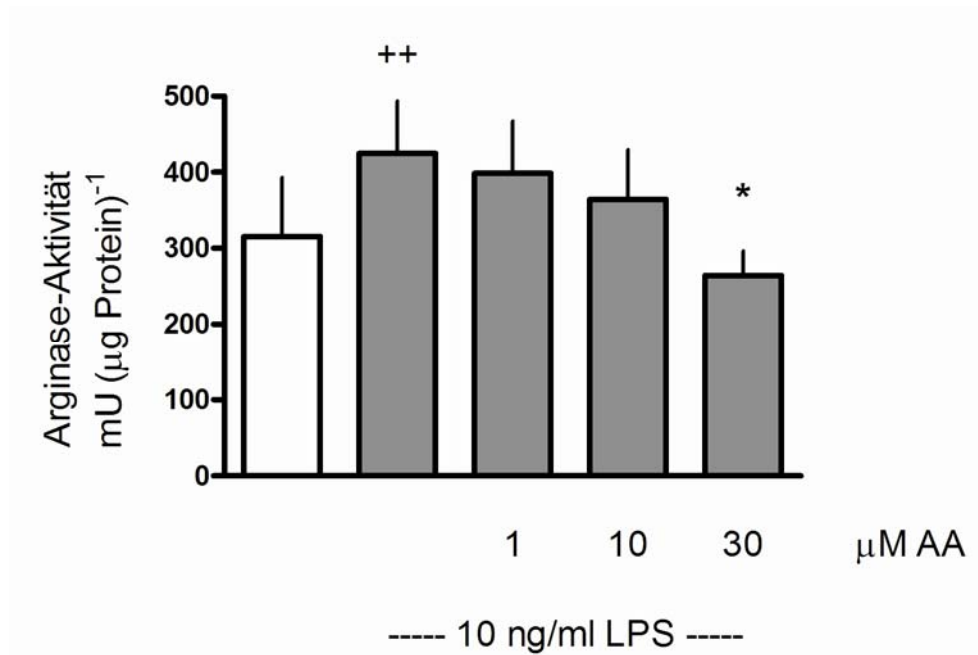


Abb.11: Wirkung von AA auf die durch LPS (10 ng/ml) induzierte Arginase Aktivität in RAM. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in mU pro µg Protein von jeweils 6 Experimenten. ++ $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle. * $P < 0,05$ im Vergleich zu LPS alleine.

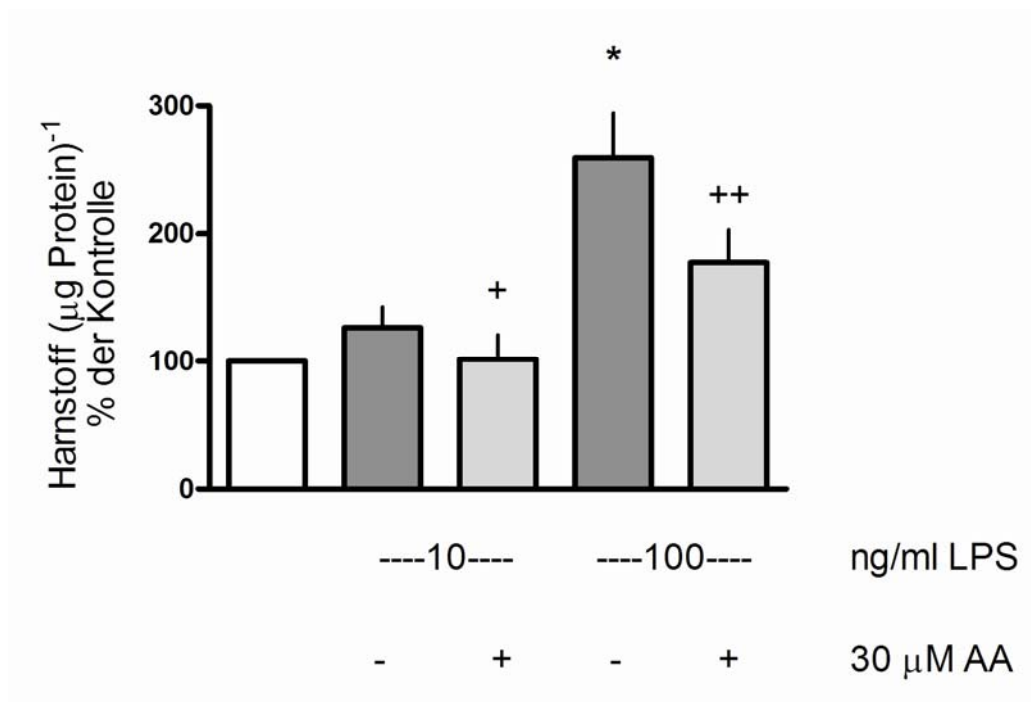


Abb.12: Wirkung von AA auf die Arginase-Aktivität in RAM. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in Harnstoffmenge pro µg Protein als %-Wert der Kontrolle von jeweils 6 Experimenten. * $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. + $P < 0,05$ im Vergleich zu LPS alleine. ++ $P < 0,005$ im Vergleich zu LPS alleine.

5.2. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von LPS und AA

Nach Standardprotokoll wurde im Überstand des Kulturmediums die Nitrit-Akkumulation nach 20-stündiger Inkubation bestimmt. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Hemmung des LPS-Effektes auf die Arginase-Aktivität ließ sich keine signifikante AA-Wirkung auf die durch 10 ng/ml LPS induzierte Aktivität der iNOS beobachten (siehe Abb.13). Versuche mit 100 ng/ml LPS brachten vergleichbare Resultate (nicht abgebildet).

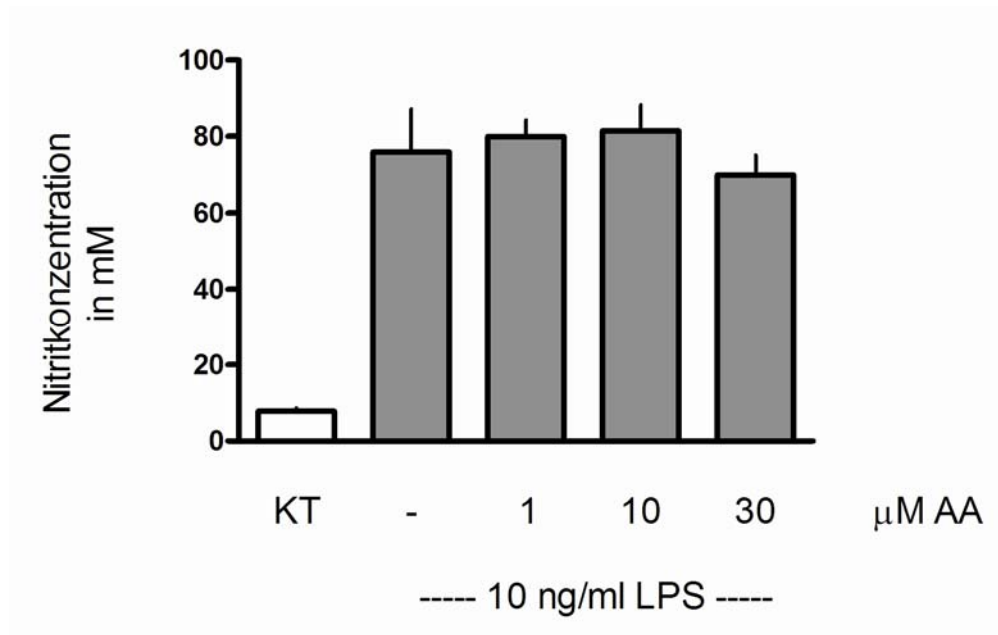


Abb.13: Wirkung von AA auf die iNOS-Aktivität in RAM nach 20-stündiger Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in Nitritkonzentration in mM (n = 5-7). Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen der LPS-stimulierten iNOS-Aktivität.

5.3. Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF und AA

Zur Bestimmung der Wirkung von AA auf den bereits beobachteten GM-CSF-Effekt auf die Arginase-Aktivität wurden RAM über 20 Stunden in Gegenwart von GM-CSF in den Konzentrationen 1, 10 und 100 ng/ml bei An- bzw. Abwesenheit von 30 μ M AA inkubiert. In dieser Konzentration zeigte AA eine statistisch signifikante Abschwächung des Effekts aller drei GM-CSF-Konzentrationen (siehe Abb. 14).

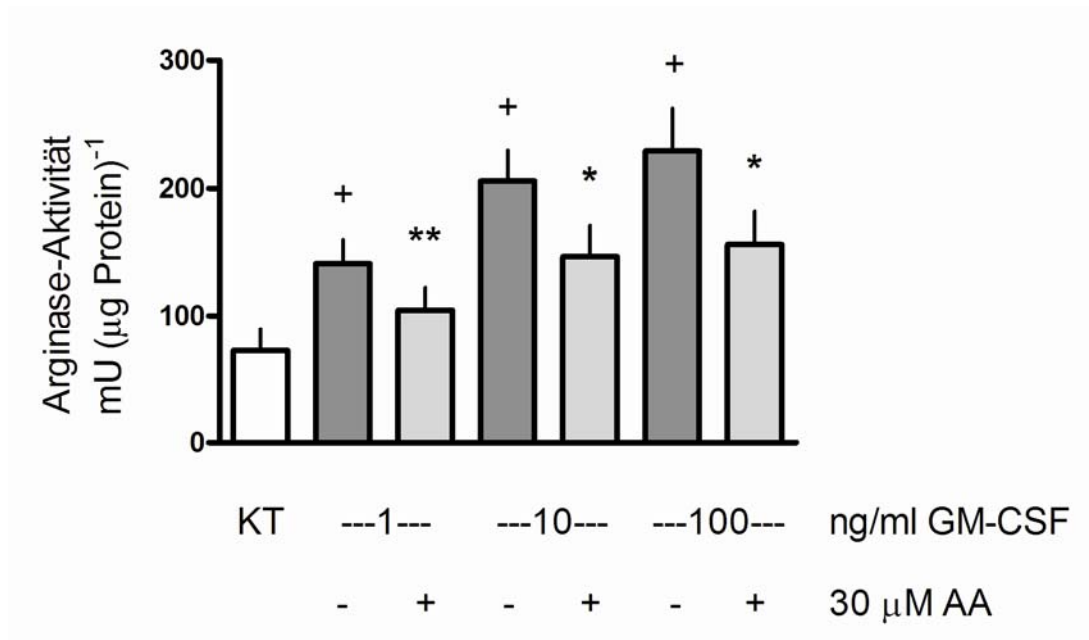


Abb.14: Wirkung von AA (30 μ M) auf die Arginase Aktivität in RAM in Gegenwart von GM-CSF (1, 10, 100 ng/ml). Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM in mU pro μ g Protein von jeweils 5 Experimenten. + $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle. * $P < 0,05$ im Vergleich zu GM-CSF alleine. ** $P < 0,0005$ im Vergleich zu GM-CSF alleine.

5.4. iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF und AA

In der Kombination von GM-CSF (1, 10, 100 ng/ml) mit 30 μ M AA ließ sich ein statistisch signifikanter Rückgang der Nitrit-Akkumulation im Überstand des Kulturmediums messen (siehe Abb. 15). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem weiter oben beobachteten, fehlenden Einfluss von AA auf den LPS-induzierten Anstieg der iNOS-Aktivität.

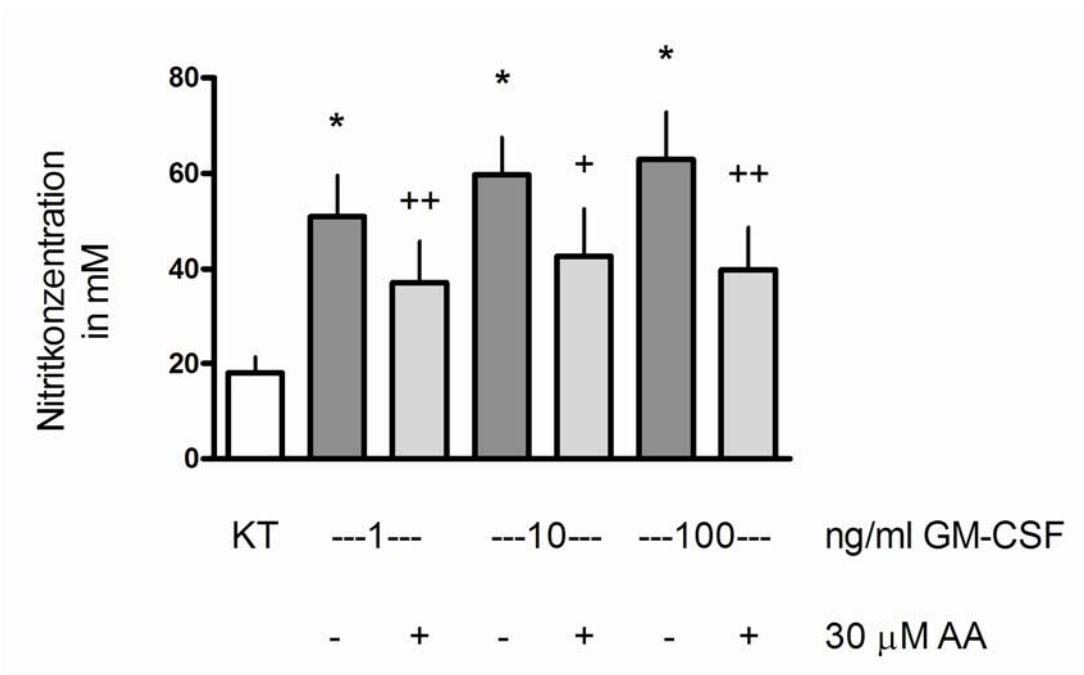


Abb.15: Einfluss von AA auf die durch GM-CSF induzierte iNOS-Aktivität in RAM. Angegeben sind die Mittelwerte plus SEM der Nitritkonzentration in mM ($n = 5$). * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. + $P < 0,05$ im Vergleich zur jeweiligen GM-CSF Konzentration alleine. ** $P < 0,005$ im Vergleich zur jeweiligen GM-CSF Konzentration alleine.

II. Untersuchungen zur Expression von Arginase I und iNOS

Nachdem auf funktioneller Ebene die Wirkung von GM-CSF auf die Enzymaktivität von Arginase und iNOS im Vergleich zu LPS und in An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason und AA charakterisiert wurde, soll in diesem zweiten Abschnitt anhand von mRNA-Expressions-Analyse mit spezifischen Primerpaaren für Arginase I und iNOS untersucht werden, in wie weit sich die Aktivitätsänderungen auf der Ebene der mRNA-Synthese widerspiegeln.

Nach Inkubation der RAM mit den zu untersuchenden Substanzen wurden die Zellen lysiert und die Gesamtheit der RNA präpariert. Im Anschluss an die Reverse Transkriptase-Reaktion wurden Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt mit spezifischen Primerpaaren für Arginase I, iNOS sowie β -Actin, welches als Housekeeping-Gen verwendet wurde.

Um das Ausmaß der Expression des Arginase I- bzw. des iNOS-Gens zu quantifizieren, wurde die optische Dichte der PCR-Banden auf Agarosegelen vermessen und in Bezug gesetzt zur Dichte des Kontrolltranskripts β -Aktin.

1. Einfluss von LPS auf die Transkription der Arginase I

Unter LPS zeigte sich eine deutliche Zunahme der Enzymaktivität im Arginase-Assay. Nun sollte geprüft werden, ob sich ein LPS-Effekt auch auf Transkriptionsebene nachweisen lässt. Hierzu wurden RAM für 5 Stunden und 20 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von 100 ng/ml LPS inkubiert, und anschließend wie oben beschrieben das Arginase I-mRNA-Produkt der Zellysate ermittelt. Hierbei zeigte sich nach 5h eine statistisch signifikante Zunahme unter LPS im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach 20h war eine erhöhte Arginase I-mRNA-Konzentration zu beobachten. Bei der geringen Probenzahl von n=3 ist sie allerdings als nicht statistisch signifikant zu werten (siehe Abb.16).

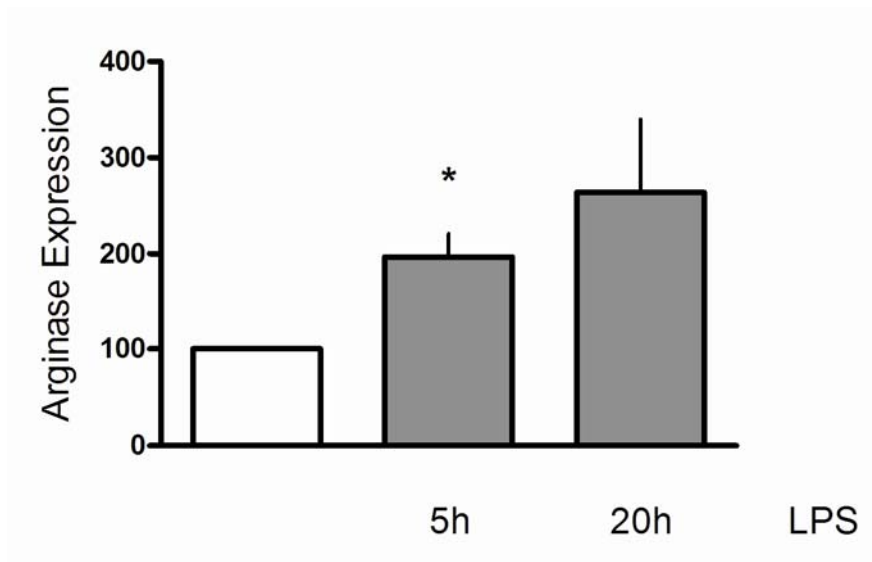


Abb.16: Einfluss von LPS (100 ng/ml) auf die mRNA-Expression der Arginase I in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert plus SEM der Quotienten der optischen Dichten der Arginase I-mRNA zu β -Actin-mRNA angegeben als % der Kontrolle (n=5 nach 5h, n=3 nach 20h). * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

1.1. Kombination mit Dexamethason

Die vorherigen Enzym-Assays demonstrierten eindrücklich die Fähigkeit des Glukokortikoids Dexamethason, die LPS-induzierte Zunahme der Arginase Aktivität vollständig zu unterdrücken. Um zu prüfen, ob sich dieser Effekt auch auf mRNA-Ebene nachweisen lässt, wurden RAM für 5 bzw. 20 Stunden mit 100 ng/ml LPS und 100 nM Dexamethason inkubiert. Dabei zeigte sich, dass der LPS-Effekt durch Dexamethason wiederum komplett inhibierbar ist. Aufgrund der geringen Probenanzahl ($n=3$) sind die 20 Stunden-Werte nur als Tendenz zu werten, eine statistische Signifikanz lässt sich nicht errechnen (siehe Abb. 17).

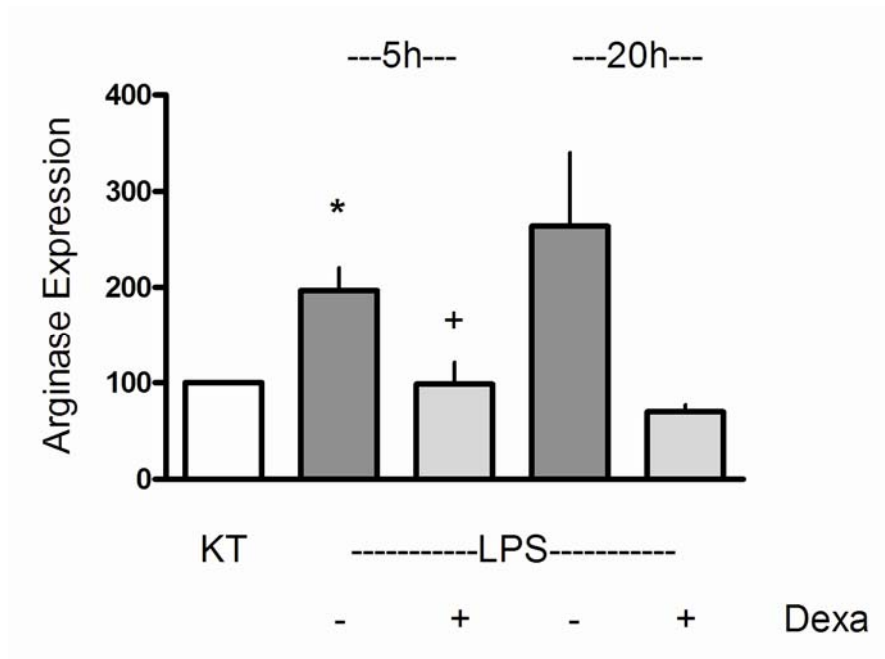


Abb.17: Einfluß von LPS (100 ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason (100 nM) auf die Arginase I-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Dargestellt wird der Mittelwert plus SEM der Quotienten der optischen Dichten der Arginase I-mRNA zu β -Actin-mRNA als % der Kontrolle. $n=5$ (5h) und $n=3$ (20h). * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. + $P < 0,05$ im Vergleich zu LPS alleine.

1.2. Kombination mit Anacardic Acid

Nachdem AA in den Arginase-Assays eine geringe, aber dennoch signifikante Hemmung der LPS-Induktion demonstrierte, soll nun überprüft werden, ob sich dieser Effekt auf der mRNA-Ebene widerspiegelt. RAM wurden hierzu über 10 Stunden in Gegenwart von 10 ng/ml LPS mit bzw. ohne AA (30 μ M) inkubiert. Nach drei unabhängigen Versuchen ließ sich kein AA-Effekt auf das mRNA-Produkt nachweisen, weder im Vergleich zur Kontrolle noch im Vergleich zu LPS alleine. Daher wurde die Versuchsreihe vorzeitig abgebrochen, und die niedrige Probenanzahl von n=3 verhinderte eine statistische Auswertung des LPS-Effektes (siehe Abb. 18).

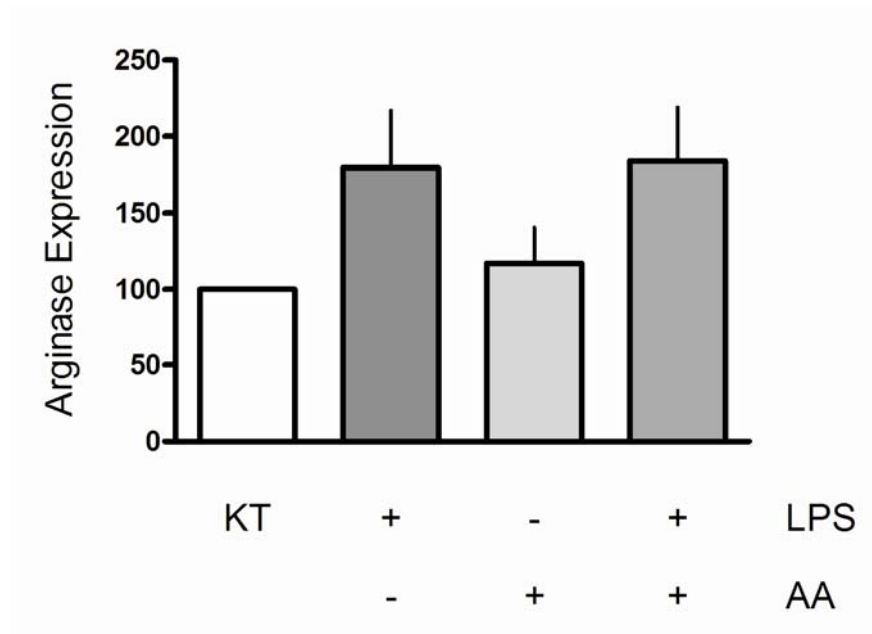


Abb.18: Einfluß von LPS (100 ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit von AA (30 μ M) auf die Arginase I-mRNA-Konzentration in RAM nach 10-stündiger Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert plus SEM der Quotienten der optischen Dichten der Arginase I-mRNA zu β -Actin-mRNA als % der Kontrolle (n=3).

2. Einfluss von GM-CSF auf die Transkription der Arginase I

In Anlehnung an das Versuchsprotokoll für die funktionellen Untersuchungen wurden RAM vor der Präparation der RNA für 5h oder 20h in An- und Abwesenheit von GM-CSF (100 ng/ml) kultiviert.

Wie aus Abb. 19 ersichtlich, konnte in RAM unter Kontrollbedingungen mRNA für Arginase I nachgewiesen werden. Kultivierung in Anwesenheit von GM-CSF (100 ng/ml) über 5 Stunden führte zu einer Verdopplung des mRNA-Produktes. Dieser Effekt war nach 20 Stunden deutlich rückläufig.

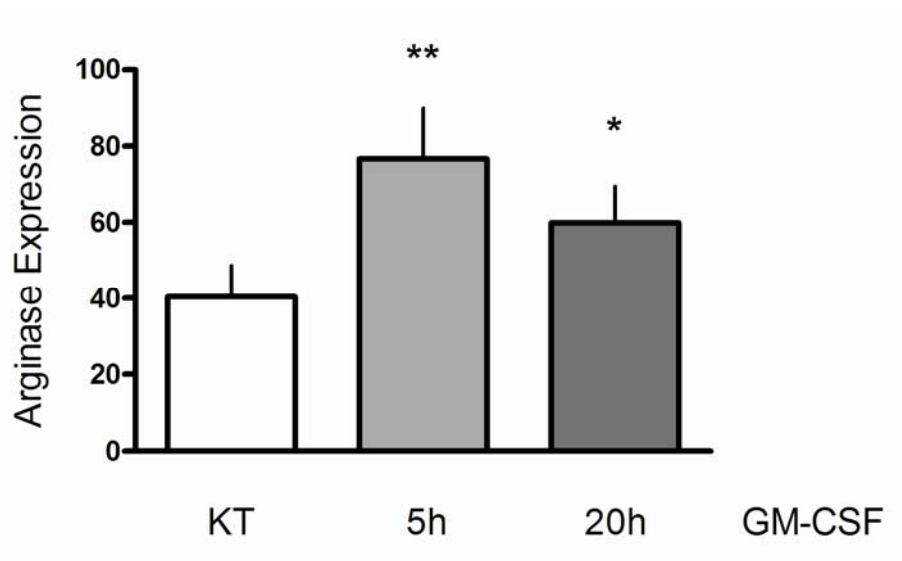


Abb.19: Einfluss von GM-CSF (100 ng/ml) auf die Arginase I-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert plus SEM der Quotienten der optischen Dichten der Arginase I-mRNA zu β -Actin-mRNA von 11 (5h) bzw. 9 (20h) unabhängigen Versuchen. * $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,0005$ im Vergleich zur Kontrolle.

2.1. Kombination mit Dexamethason

RAM wurden vor der RNA-Präparation für 5h bzw. 20h in An- und Abwesenheit von GM-CSF (100 ng/ml) und Dexamethason (100 nM) kultiviert. Der in den Arginase-Assays beobachtete hemmende Effekt des Dexamethason auf die durch GM-CSF induzierte Enzym-Aktivität ließ sich auf der Ebene der mRNA-Expression nicht bestätigen (siehe Abb.20).

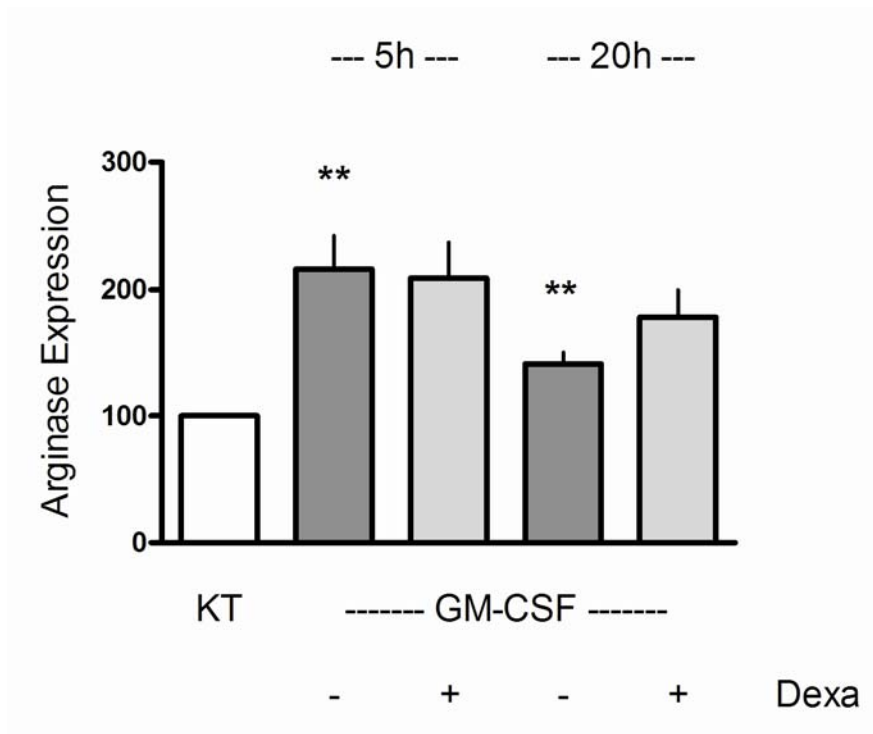


Abb.20: Einfluss von GM-CSF (100 ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason (100 nM) auf die Arginase I-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert plus SEM der Quotienten aus Arginase I-mRNA zu β -Actin-mRNA als % der Kontrolle. n=5 (5h) und n=4 (20h). ** P < 0,005 im Vergleich zur Kontrolle.

2.2. Kombination mit Anacardic Acid

Um die Wirkung von AA auf die durch GM-CSF erhöhte Transkription des Arginase I-Gens zu untersuchen, wurden RAM wiederum für 5 bzw. 20 Stunden in Gegenwart von GM-CSF (100 ng/ml) mit bzw. ohne AA (30 μ M) inkubiert. Wie nach den Resultaten der PCR-Versuche zur Kombination von AA und LPS zu erwarten war, zeigte AA auch in dieser Versuchsanordnung keine signifikante Wirkung auf die Menge an produzierter mRNA. Abbildung 21 zeigte die Ergebnisse nach 5 Stunden. Ein vergleichbares Bild zeigte sich nach 20-stündiger Inkubation (nicht dargestellt).

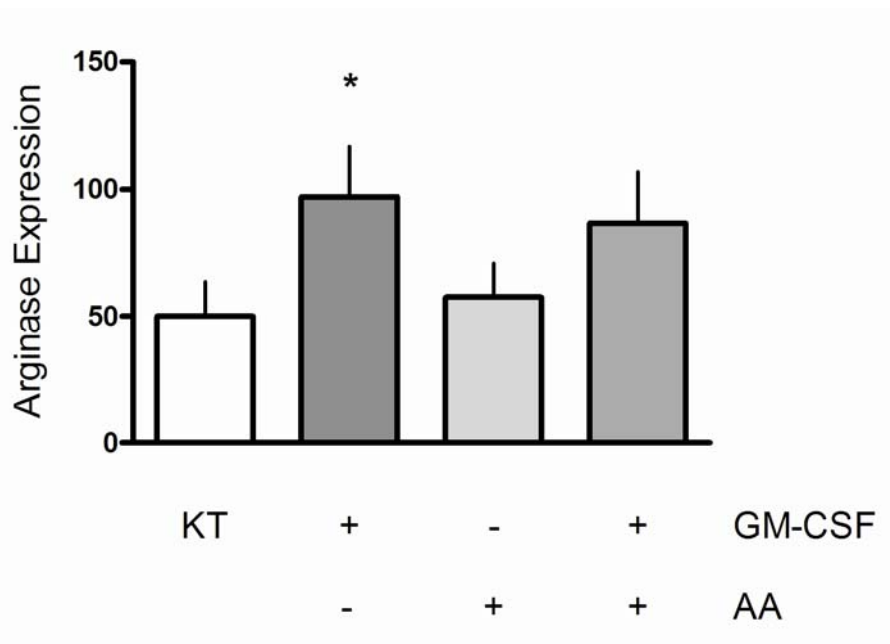


Abb.21: Einfluß von AA alleine und in Kombination mit GM-CSF (100 ng/ml) auf die Arginase I-mRNA-Konzentration in RAM nach 5-stündiger Inkubation. Dargestellt wird der Mittelwert plus SEM der Quotienten aus Arginase I-mRNA zu β -Actin-mRNA von 6 unabhängigen Versuchen. * $P < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle. AA zeigt keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Arginase I-Transkription.

3. Einfluss von LPS auf die Transkription der iNOS

Der Einfluss von LPS auf die Transkription des iNOS-Gens wurde bestimmt nach Inkubationszeiten von 5 und 10 Stunden. Es zeigte sich eine sehr starke Induktion des Gens nach 5 Stunden. Die mRNA-Menge nach 10 Stunden war bereits deutlich rückläufig und bei der geringen Fallzahl (n=3) nicht mehr als statistisch signifikant zu werten.

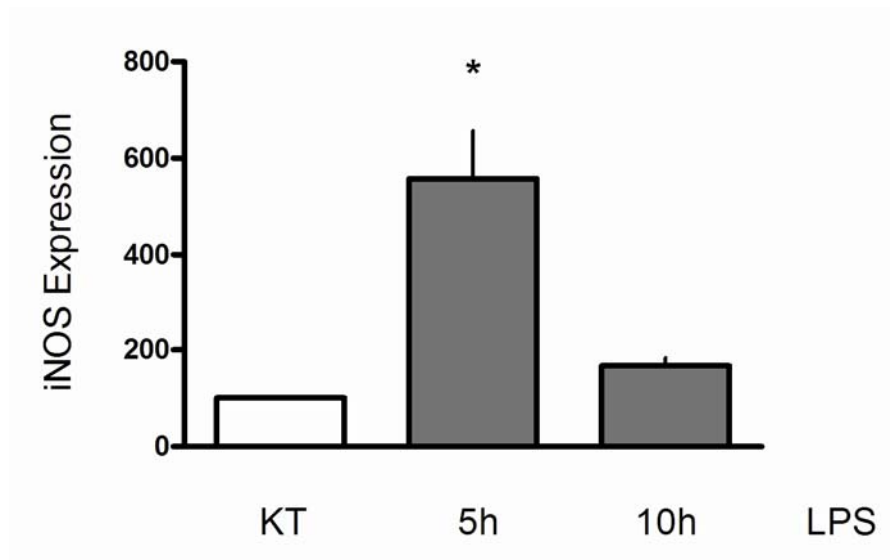


Abb.22: Einfluß von LPS (100 ng/ml) auf die iNOS-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 10 Stunden Inkubation. Mittelwert plus SEM der Quotienten aus iNOS-mRNA zu β -Actin-mRNA von 4 (5h) und 3 (10h) unabhängigen Versuchen. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle im Mann-Whitney-Test.

3.1. Kombination mit Dexamethason

Wie schon in den entsprechenden Versuchen zur Enzymaktivität vermochte Dexamethason auch auf mRNA-Ebene den LPS-Effekt auf die iNOS abzuschwächen. Allerdings fiel die Reduktion der Enzym-Aktivität wesentlich schwächer aus, als die hier beobachtete fast vollständige Unterdrückung der LPS-induzierten Transkriptionssteigerung. Abb. 23 zeigt die Ergebnisse nach 5-stündiger Inkubation.

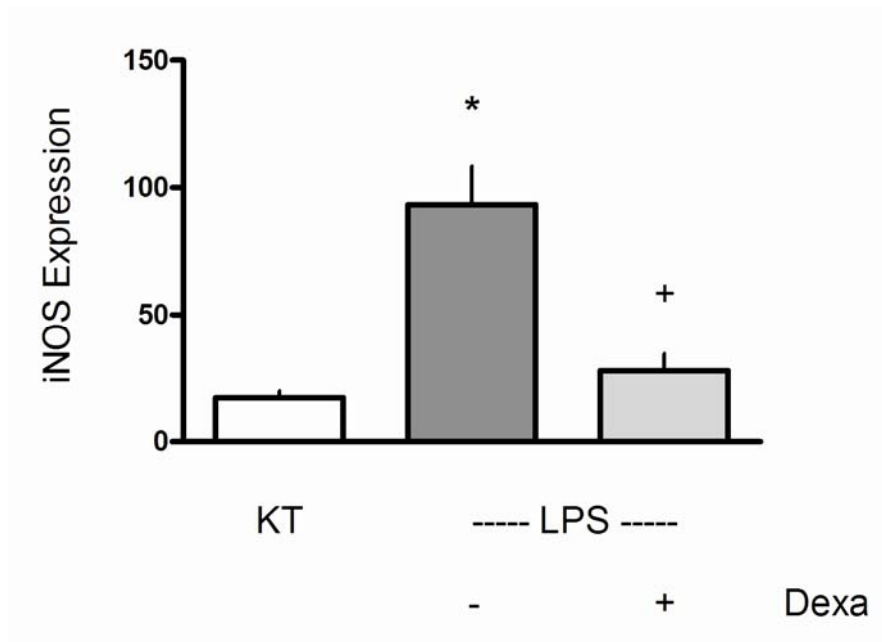


Abb.23: Einfluß von LPS (100 ng/ml) und Dexamethason (100 nM) auf die iNOS-mRNA-Konzentration in RAM nach 5-stündiger Inkubation. Mittelwert plus SEM der Quotienten aus iNOS-mRNA zu β -Actin-mRNA von 4 unabhängigen Versuchen. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. + $P < 0,05$ im Vergleich zu LPS.

3.2. Kombination mit Anacardic Acid

Nachdem in den Enzym-Assays kein hemmender Effekt von AA auf die durch LPS induzierte Aktivität der iNOS zu beobachten war, wurden dieses Ergebnis auch auf Transkriptionsebene bestätigt. Nach 10-stündiger Inkubation von RAM in Gegenwart von LPS (10 ng/ml) und/oder AA zeigte sich eine Verdopplung des iNOS-Transkriptes in Gegenwart von LPS.

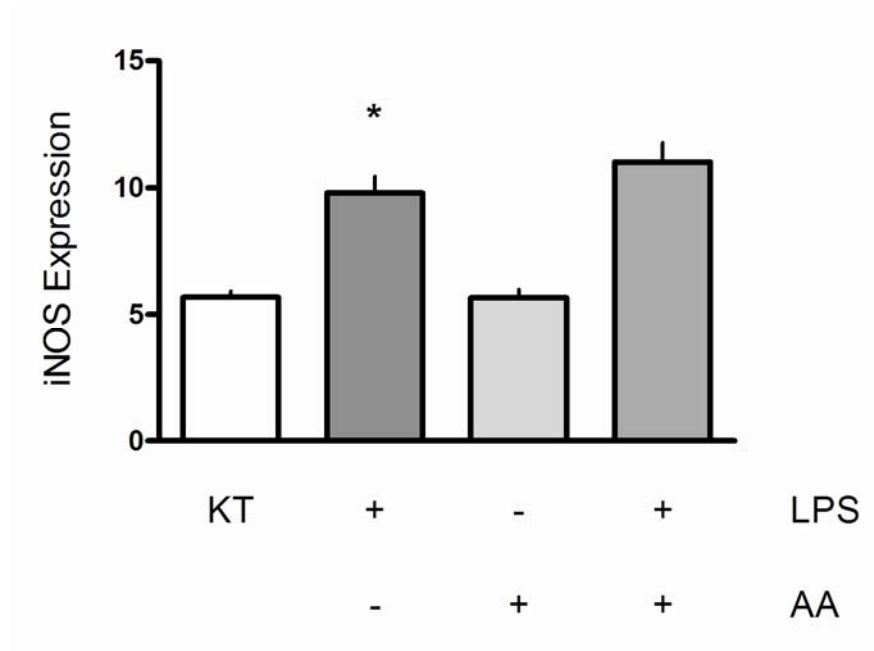


Abb.24: Einfluß von LPS (10 ng/ml) und AA (30 μ M) auf die iNOS-mRNA-Konzentration in RAM nach 10-stündiger Inkubation. Mittelwert plus SEM der Quotienten aus iNOS-mRNA zu β -Actin-mRNA von 3 unabhängigen Versuchen. * $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle im ungepaarten T-Test.

4. Einfluss von GM-CSF auf die Transkription der iNOS

Um den Einfluss von GM-CSF auf die Transkription des iNOS-Gens zu untersuchen, wurden RAM in An- oder Abwesenheit von GM-CSF (100 ng/ml) über 5 bzw. über 20 Stunden inkubiert. Die anschließende Bestimmung des iNOS-mRNA-Produktes zeigte eine Induktion der Gentranskription durch GM-CSF, die bereits nach 5 Stunden bei ca. 140% lag und sich nach 20 Stunden weiter steigerte auf ca. 190% des Kontrollwertes (Abb.25). Somit folgt die Induktion der iNOS durch GM-CSF einer anderen Kinetik als die der Arginase, deren mRNA-Produkt nach 20 Stunden bereits wieder unter den 5 Stunden-Werten liegt (Abb.19).

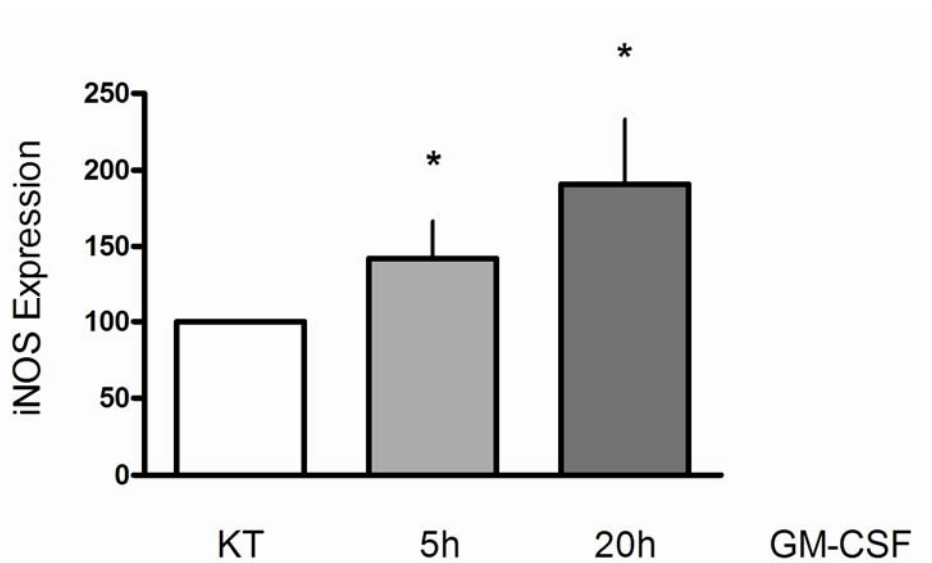


Abb.25: Einfluß von GM-CSF (100 ng/ml) auf die iNOS-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Mittelwert plus SEM der Quotienten aus iNOS-mRNA zu β -Actin-mRNA als %-Wert der Kontrolle. n=10 (nach 5 h) bzw. n=7 (nach 20 h). * P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle im Mann-Whitney-Test.

4.1. Kombination mit Dexamethason

Dexamethason inhibiert die durch GM-CSF induzierte Zunahme der iNOS-Aktivität. In dieser Versuchsreihe sollte demonstriert werden, ob dieser Effekt auch auf Transkriptionsebene nachweisbar ist. Hierfür wurden RAM über 5 bzw. 20 Stunden entweder in Gegenwart von GM-CSF alleine oder in Kombination mit Dexamethason inkubiert. Wie aus Abb. 26 hervorgeht, wurde unter dem Einfluss von Dexamethason weniger iNOS-mRNA synthetisiert.

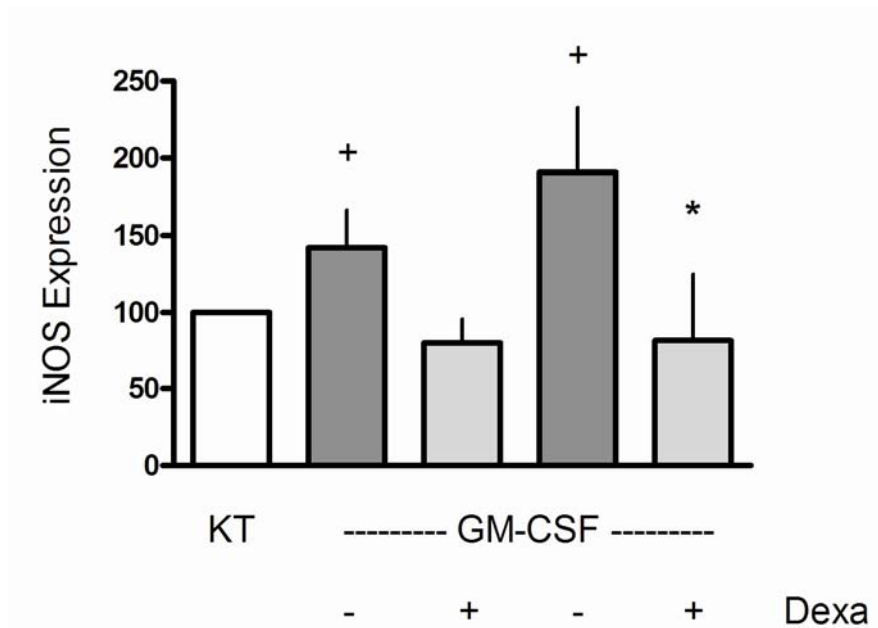


Abb.26: Einfluß von GM-CSF (100 ng/ml) und Dexamethason (100 nM) auf die iNOS-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Mittelwert plus SEM der Quotienten aus iNOS-mRNA zu β -Actin-mRNA als %-Wert der Kontrolle von jeweils 4 unabhängigen Versuchen. + $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle im Mann-Whitney-Test. * $P < 0,05$ im Vergleich zu GM-CSF alleine.

4.2. Kombination mit Anacardic Acid

Im Gegensatz zu den LPS-Versuchen, in denen AA weder Einfluss auf die iNOS-Aktivität noch auf das iNOS-Transkriptionsprodukt zeigte, vermochte AA die durch GM-CSF induzierte iNOS-Aktivität statistisch signifikant zu senken. Um zu prüfen, ob dieser Effekt auch auf Transkriptionsebene zu beobachten ist, wurden RAM in Gegenwart von GM-CSF und in An- bzw. Abwesenheit von AA für 5 und 20 Stunden inkubiert. Dabei konnte kein AA-Effekt auf das iNOS-Transkriptionsprodukt demonstriert werden.

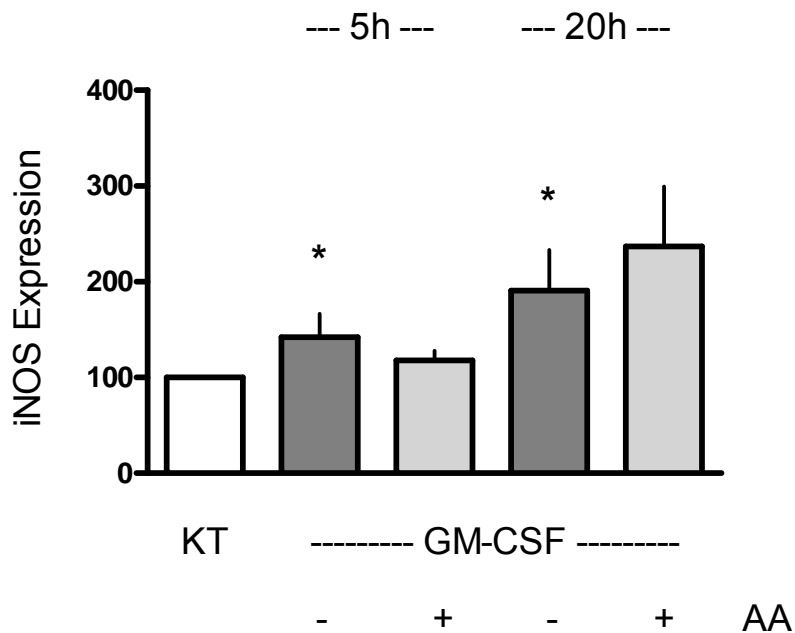


Abb.27: Einfluß von GM-CSF (100 ng/ml) und AA (30 μ M) auf die iNOS-mRNA-Konzentration in RAM nach 5 bzw. 20 Stunden Inkubation. Mittelwert plus SEM der Quotienten aus iNOS-mRNA zu β -Actin-mRNA als %-Wert der Kontrolle. n=6 (nach 5h) bzw. n=3 (nach 20h). AA hat in dieser Versuchsanordnung keinen Einfluss auf den GM-CSF-Effekt. * P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle im Mann-Whitney-Test.

E. DISKUSSION

Als Teil des angeborenen Immunsystems stellen Alveolarmakrophagen die erste Verteidigungslinie der Lunge dar. Sie sind in der Lage, den Großteil von Fremdmaterial und eindringenden Pathogenen aus den distalen Atemwegen zu entfernen (Sibille und Reynolds, 1990). Zusätzlich zu ihren zytotoxischen Eigenschaften vermitteln sie durch Antigen-Präsentation und die Ausschüttung einer Vielzahl verschiedener Zytokine die Einleitung der Entzündungsreaktion und der erworbenen Immunreaktion (Fearon und Locksley, 1996).

GM-CSF gilt als ein zentraler Regulator der Differenzierung und Aktivierung von Alveolarmakrophagen und ist für eine adäquate Funktion der angeborenen Immunabwehr, speziell in der Lunge, unabdingbar (Hamilton und Anderson, 2004; Shibata et al., 2001). Andererseits ist eine übermäßige Expression dieses Zytokins auch in einer Reihe von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen impliziert.

Der Arginin-Stoffwechsel ist von besonderer Bedeutung im Entzündungsgeschehen nach Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Im Vordergrund steht dabei die Wechselwirkung der beiden in Makrophagen induzierbaren Enzyme iNOS und Arginase I, die um das gemeinsame Substrat L-Arginin konkurrieren. Während die Verwendung der Aminosäure durch iNOS zur Synthese des zytotoxischen Stickstoffmonoxid führt, vermittelt Arginase I durch die Bereitstellung von Prolin und Polyaminen Geweberegeneration und –proliferation.

I. GM-CSF-Effekt auf Expression von Arginase I und iNOS

Eine Charakterisierung der Wirkung von GM-CSF auf Expression und Aktivität der Arginase I und iNOS in Alveolarmakrophagen ist bisher nicht beschrieben und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zur Beurteilung des Effektes von GM-CSF wurden sowohl funktionelle Untersuchungen auf Ebene der Enzymaktivität als auch die Bestimmung der mRNA-Mengen durch RT-PCR in primären RAM angewandt.

Anhand der jeweiligen Enzym-Assays konnte in nicht-stimulierten Alveolarmakrophagen eine basale Aktivität sowohl der Arginase als auch der iNOS bestätigt werden. Inkubation der Alveolarmakrophagen in Gegenwart von GM-CSF führt zu einer Aktivitätssteigerung beider Enzyme (Abb. 3 bzw. 4). In der Literatur ist wiederholt von einem funktionellen Antagonismus in der Regulation dieser beiden Enzyme berichtet worden. So induzieren Th₁-Zytokine ausschließlich die iNOS, während Th₂-Zytokine die Arginase I induzieren (Corraliza et al.,

1995;Munder et al., 1998;Mills et al., 2000). Eine parallele Hochregulation beider Enzyme ist dagegen nach Stimulation der Zellen durch LPS beschrieben (Louis et al., 1999;Klasen et al., 2001;Sonoki et al., 1997). Eine Induktion der Arginase I durch GM-CSF konnte kürzlich auch in Makrophagen im Rahmen der Angiogenese beobachtet werden (Jost et al., 2003).

Bei der Beurteilung der Ergebnisse des Arginase-Assays ist der Aufbau dieses Experiments zu bedenken. Bestimmt wurde der L-Arginin-Umsatz über eine Stunde in Abwesenheit von iNOS-Aktivität und bei Substratüberschuss. Die Ergebnisse spiegeln daher die Menge des in den Zellen vorhandenen Arginase-Proteins wider. Die Aktivität des Enzyms in den Zellen wird durch die Konkurrenzsituation mit der iNOS und limitiertem Substratangebot unter der hier gemessenen Aktivität liegen.

Zudem muss erwähnt werden, dass die hier bestimmte Arginase-Aktivität nicht spezifisch der Arginase I zugeschrieben werden darf. Der gemessene Umsatz von L-Arginin zu Harnstoff spiegelt vielmehr die Aktivität beider Isoenzyme, Arginase I und Arginase II, wider. Arginase II kann nach geeigneter Stimulation in Makrophagen induziert werden. Allerdings konnte speziell im Fall von Rattenalveolarmakrophagen demonstriert werden, dass der Beitrag der Arginase II zur gesamten Arginase-Aktivität gering ist (Klasen et al., 2001). Daher wird im Rahmen dieser Arbeit die gemessene Arginase-Aktivität gleichgesetzt mit der Aktivität der Arginase I.

Als proinflammatorisches Zytokin aktiviert GM-CSF Makrophagen über einen membranständigen Rezeptor. Der GM-CSF-Rezeptor nutzt verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionspfade, die letztlich zu einer gesteigerten Transkription der Zielgene führen. Einer dieser Pfade beinhaltet die Aktivierung verschiedener STATs vornehmlich durch JAK2. STAT5 scheint der vorherrschende Vertreter der STATs zu sein, die durch den GM-CSF-Rezeptor rekrutiert werden. Aber auch eine Beteiligung von STAT1 und 3 an der Signaltransduktion in Makrophagen wird beschrieben (de Groot et al., 1998). Kürzlich konnte einer der Regulationsmechanismen der Arginase I-Expression in der Makrophagenzelllinie RAW identifiziert werden (Pauleau et al., 2004). Dabei wurde gezeigt, dass die Induktion der Arginase I durch IL-4 von der Aktivierung von STAT6 abhängig ist. Eine Rekrutierung von STAT6 durch GM-CSF in Makrophagen wurde bisher nicht beschrieben. Allerdings vermittelt STAT6 einen Teil der GM-CSF-Effekte auf Dendritische Zellen (Welte et al., 1997), so dass eine Beteiligung dieses Signaltransduktionsweges an der hier beobachteten Induktion der Arginase I durch GM-CSF in Alveolarmakrophagen möglich ist.

Es ist zudem vorstellbar, dass GM-CSF nicht direkt Einfluss nimmt auf die Expression von Arginase I und iNOS. Als ein natürlicher Aktivator des Immunsystems induziert GM-CSF die Synthese einer Vielzahl von weiteren Zytokinen in Makrophagen. Somit wäre es möglich, dass GM-CSF indirekt über die Induktion eines weiteren Mediators die Transkription beider Gene beeinflusst. Ein solcher para- bzw. autokriner Effekt als Reaktion auf die Stimulation durch GM-CSF lässt sich allerdings mit dem gewählten Versuchsaufbau weder ausschließen noch belegen. In diesem Zusammenhang konnte durch Neutralisation von GM-CSF in LPS-stimulierten Mäusen demonstriert werden, dass diesem Zytokin eine zentrale Rolle in der Einleitung der Immunreaktion zukommt, und dass ein Mangel an GM-CSF die adäquate Synthese weiterer Entzündungsmediatoren unterbindet (Bozinovski et al., 2004).

LPS ist ein Endotoxin aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Es ist ein wesentlicher Aktivator der Alveolarmakrophagen und somit des angeborenen Immunsystems der Lunge, welches eine essentielle Rolle spielt in der antimikrobiellen Verteidigung gegenüber solcher Organismen (Ulevitch und Tobias, 1999; Martin, 2000). Eine eingehende Charakterisierung der Effekte von LPS auf Arginase I und iNOS in Rattenalveolarmakrophagen wurde bereits durch Klasen et al. vorgenommen (Klasen et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse erneut bestätigt werden. Das Hauptaugenmerk liegt daher in erster Linie auf der Charakterisierung der Effekte von GM-CSF und auf der Beurteilung dieser Effekte im Vergleich zu LPS.

Bei der parallelen Betrachtung der Effekte von LPS und GM-CSF zeigten beide Substanzen eine vergleichbare Induktion sowohl der Aktivität als auch der Expression von Arginase I und iNOS in Alveolarmakrophagen. Diese Beobachtung verdeutlicht die enge Kopplung beider Stimuli in der Einleitung der pulmonalen Entzündungsreaktion. In diesem Zusammenhang konnte demonstriert werden, dass in Alveolarmakrophagen die GM-CSF-Konzentrationen nach Stimulation durch LPS deutlich ansteigen (Meja et al., 2000). Tatsächlich erzielt LPS einen Großteil seiner Wirkung auf das Immunsystem durch die Induktion der Synthese von GM-CSF in Makrophagen (Koch et al., 2004; Puljic et al., 2007). Die GM-CSF-Synthese steht dabei am Anfang der proinflammatorischen Reaktion. In einem murinen Model der COPD zeigte sich nach Stimulation durch LPS eine frühzeitige Induktion von GM-CSF und erst im Anschluss eine Zunahme weiterer Chemokine und ein Influx von Neutrophilen. Die Neutralisation von GM-CSF durch einen spezifischen Antikörper bewirkte in diesem Modell einen Rückgang sowohl der Zahl der Neutrophilen als auch der Konzentration der Chemokine MIP-2 und TNF- α in BAL-Flüssigkeit, was für die dominante Rolle von GM-CSF in der Ein-

leitung pulmonaler Entzündungsreaktionen spricht (Puljic et al., 2007). Gleichzeitig scheint eine basale GM-CSF-Aktivität in der Lunge aber auch eine Voraussetzung dafür zu sein, dass LPS seine proinflammatorische Wirkung entfalten kann. In den Alveolen bindet LPS an das dort vorliegende, lösliche LPS-binding protein, welches im Folgenden an den Toll Like Receptor 4 (TLR4) auf der Oberfläche der Makrophagen bindet und diesen aktiviert. TLR4 wiederum aktiviert im Intrazellulärraum den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B und leitet somit die Immunaktivierung ein. Zu den vielfältigen Wirkungen von GM-CSF auf Makrophagen zählt auch die Induktion des TLR4. Tatsächlich unterdrückt die Neutralisation der basalen pulmonalen GM-CSF-Aktivität in Mäusen durch spezifische Antikörper die Immunreaktion auf eine anschließende Stimulation durch LPS (Bozinovski et al., 2004). Diese Beobachtungen verdeutlichen die enge Beziehung dieser beiden Substanzen in der Regulation des angeborenen Immunsystems der Lunge. Die wesentlich stärkere Induktion der iNOS durch LPS (Abb. 22) im Vergleich zu GM-CSF (Abb. 25) deutet allerdings darauf hin, dass nicht die gesamte Wirkung des Endotoxins durch GM-CSF vermittelt wird.

1.1 Einfluß von Glukokortikoiden auf den GM-CSF-Effekt

Glukokortikoide zeigen eine weit reichende antiinflammatorische Wirkung und stellen eine Säule der Therapie des Asthma bronchiale dar. Eine Hemmung der Expression und Aktivität der Arginase I und iNOS durch Dexamethason wurde in der Literatur bereits beschrieben (Klasen et al., 2001). In dieser Arbeit sollte nun geprüft werden, in wieweit dieses Glukokortikoid die GM-CSF-Effekte zu modulieren vermag.

Dexamethason alleine zeigte in den durchgeführten Versuchen keine signifikante Wirkung auf die basale Arginase-Aktivität (Abb. 5). Hier war allenfalls eine tendenzielle Abschwächung der Harnstoffsynthese zu erkennen. Die GM-CSF-induzierte Steigerung der Arginase-Aktivität wurde allerdings durch das Glukokortikoid weitgehend aufgehoben (Abb. 7). Ein unerwartetes Ergebnis brachte die Untersuchung zur Expression von Arginase I unter Einfluss von GM-CSF und Dexamethason. Interessanter Weise verursachte das Glukokortikoid selber eine Zunahme der mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle (ohne Abb.). Ein induktiver Effekt von Glukokortikoiden auf die Expression der Arginase I ist bekannt in Hepatozyten. Hier wird die Arginase im Rahmen des Harnstoffzyklus exprimiert und die Expression der beteiligten Enzyme wird durch eine Reihe verschiedener Stimuli, darunter auch Glukokortikoide, aufeinander abgestimmt (Jenkinson et al., 1996). Die gesteigerte Gen-Transkription beruht in diesem Fall auf einer indirekten Glukokortikoidwirkung, die die *de novo* Synthese

des Transkriptionsfaktors C/EBP β durch das Steroidhormon voraussetzt (Gotoh et al., 1997b). Gleichwohl auch in Makrophagen eine Beteiligung von C/EBP β an der Arginase I-Expression bekannt ist, induzieren Glukokortikoide hier nicht die Synthese dieses Transkriptionsfaktors. Im Gegenteil wird in der Literatur ein repressiver Effekt der Glukokortikoide auf die Expression des Arginase I-Gens in verschiedenen Makrophagenpopulationen beschrieben, darunter die RAW 264.7-Zelllinie (Morris, Jr. et al., 1998) und speziell auch RAM (Klasen et al., 2001).

Eine Erklärung für die beobachtete Steigerung der Arginase I-Expression unter Dexamethason im Vergleich zur Kontrolle ist letztlich nicht möglich. Auch geht die erhöhte mRNA-Konzentration wie oben beschrieben nicht mit einer verstärkten Arginase-Aktivität der mit Dexamethason inkubierten Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe einher.

Ungeachtet dessen zeigt sich, dass GM-CSF die Transkription des Arginase I-Gens nicht über das mit Dexamethason erzielte Niveau hinaus anzuheben vermag (Abb. 20). Das Glukokortikoid unterbindet die weitere Induktion des Gens durch GM-CSF, und dies könnte eine Erklärung für die beobachtete Hemmung der GM-CSF-induzierten Arginase-Aktivität sein.

Verschiedene Mechanismen der Gen-Repression durch Glukokortikoide kommen hierbei in Betracht. Grundsätzlich werden die Effekte der Glukokortikoide durch Bindung an einen intrazellulären Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt. In seiner inaktiven, nicht-steroidhormongebundenen Form wird der GR im Zytosol der Zelle durch verschiedene Proteine komplexiert, wie beispielsweise Hitzeschockproteinen Hsp 90, Hsp 70 und Hsp 56. Der Rezeptor besitzt mehrere funktionale Domänen, darunter eine zur Bindung des Liganden, eine DNA-Bindungsdomäne und zwei Domänen, die beteiligt sind an der Transaktivierung von Genen, die im Anschluss an DNA-Bindung des Rezeptors erfolgt (Karin, 1998). Nach Bindung des Liganden dissoziieren die Hsp vom GR ab und es kommt zur Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes in den Zellkern, wo er als Homodimer an eine spezifische DNA-Bindungsstelle, das Glukokortikoid Response Element (GRE), bindet und somit die Transkription der Gene beeinflusst. Auf diese Weise wird eine kleine Zahl von antiinflammatorischen Genen direkt induziert (*trans*-Activation). Zu diesen Genen zählen unter anderem IL-10 und der NF- κ B-Inhibitor I- κ B α . Somit könnte die *de novo* Synthese von I- κ B α für die Hemmung einer NF- κ B-vermittelten GM-CSF-Induktion der Arginase I verantwortlich sein.

Der Großteil des entzündungshemmenden Effektes der Glukokortikoide besteht allerdings nicht in der Induktion antiinflammatorischer, sondern vielmehr in der Unterdrückung proinflammatorischer Gene. Dieser inhibitorische Effekt wird einerseits durch Bindung des GR an so genannte negative GREs (nGREs) in den Promotern empfindlicher Gene vermittelt

(Dostert und Heinzel, 2004). Eine Unterdrückung der Gentranskription wird in diesem Fall durch die Rekrutierung einer HDAC durch den GR erreicht (Ito et al., 2000). Allerdings wird nur eine geringe Anzahl Gene durch diese direkte Wirkung der Glukokortikoide unterdrückt. Ein zweiter, wesentlich weiter verbreiteter Mechanismus beruht auf einer direkten Protein-Protein-Wechselwirkung des aktivierten GR mit den proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Barnes und Karin, 1997). Der GR bindet dabei die p65-Untereinheit von NF- κ B und unterbindet dadurch die Aktivierung der Gentranskription.

Nach Inkubation mit GM-CSF wurde in den Alveolarmakrophagen vermehrt iNOS exprimiert (Abb. 25), was mit einem Anstieg der Nitritkonzentration, und somit einer gesteigerten Enzymaktivität, einherging (Abb. 4). Dexamethason unterdrückte die GM-CSF-induzierte iNOS-Aktivität vollständig (Abb. 7). Auch die mRNA-Synthese wurde bei Inkubation mit GM-CSF und Dexamethason auf Werte unterhalb des Kontrollniveaus reduziert (Abb. 26). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Vorstellung, dass die Regulation der NO-Synthese in erster Linie auf Ebene der Gen-Transkription stattfindet (Xie et al., 1992). Der hemmende Effekt der Glukokortikoide auf die Induktion der iNOS durch LPS wurde in der Literatur bereits ausführlich beschrieben und konnte hier erneut bestätigt werden (Hey et al., 1995; Klasen et al., 2001). Als Wirkmechanismus wird hier eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den aktivierten GR diskutiert.

I.2 Einflüsse von NF- κ B-Inhibitoren auf den GM-CSF-Effekt

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das Glukokortikoid Dexamethason ein hemmender Effekt auf die GM-CSF-induzierte Enzymaktivität von Arginase und iNOS bestätigt werden (Abb. 7 bzw. 8). Wie bereits beschrieben, beruht die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide vor allem auf einer Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

In einem weiteren Schritt konnte anhand der spezifischen NF- κ B-Inhibitoren PDTC (Sherman et al., 1993) und TLCK (Kim et al., 1995) die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Vermittlung des GM-CSF-Effektes auf Arginase I und iNOS bestätigt werden.

NF- κ B liegt im inaktivierten Zustand im Zytosol an die inhibierende Untereinheit I- κ B gebunden vor. Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli, darunter auch Zytokine, aktivieren NF- κ B. Aktivierung von Zellmembranrezeptoren durch geeignete Stimuli führt zur Phosphorylierung der I- κ B-Kinase (IKK). Die aktivierte I- κ B-Kinase wiederum phosphoryliert die inhibierende

Untereinheit I- κ B, die daraufhin von NF- κ B dissoziiert und den Transkriptionsfaktor freigibt (Baldwin, Jr., 2001).

In den vorliegenden Untersuchungen verursachten sowohl PDTC als auch TLCK eine ausgeprägte Hemmung der GM-CSF-induzierten Arginase- und iNOS-Aktivität (Abb. 9 bzw. 10). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass GM-CSF über eine Rekrutierung von NF- κ B die Transkription der Gene für Arginase I und iNOS positiv reguliert. Zu dieser Beobachtung passt auch, dass die Aktivität von NF- κ B in asthmatischen Atemwegen deutlich erhöht ist (Hart et al., 1998), und dass kürzlich eine Aktivierung der I- κ B-Kinase durch die α -Untereinheit des aktivierten GM-CSF-Rezeptors beschrieben werden konnte (Ebner et al., 2003).

I.3 Einflüsse von HAT-Inhibitoren auf den GM-CSF-Effekt

Histone stellen die Hauptproteinkomponente des Chromatins dar. Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass posttranskriptionelle Modifikationen der Histone entscheidenden Einfluss nehmen auf die Steuerung der Genexpression.

Untersuchungen ergaben eine gesteigerte HAT-Aktivität bei gleichzeitig reduzierter HDAC-Aktivität in Alveolarmakrophagen (Cosio et al., 2004) sowie in bronchialen Biopsien von Asthmatikern (Ito et al., 2002). Dieses veränderte Aktivitätsprofil ging einher mit einer verstärkten Expression proinflammatorischer Proteine (Cosio et al., 2004).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt seine transkriptionssteigernde Wirkung über eine Zunahme der Histonacetylierung. Die Acetylierung betrifft vor allem die Histone H3 und H4 in NF- κ B-sensiblen Promotern proinflammatorischer Gene (Ito et al., 2000). Nach Bindung an die DNA rekrutiert NF- κ B einen großen Koaktivatorkomplex, der die HAT-Proteine CBP und p300/CBP-associated factor enthält.

Um zu prüfen, ob eine gesteigerte Histonacetylierung an der Induktion von Arginase und iNOS durch GM-CSF beteiligt ist, wurde Anacardic Acid als ein wirkungsvoller nicht-selektiver Inhibitor der HAT-Aktivität (Balasubramanyam et al., 2003; Sun et al., 2006) eingesetzt. Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) ist eine unter anderem aus der Schale der Cashewnuss gewonnene, als Naturheilmittel bekannte Substanz, der antiinflammatorische sowie anti-neoplastische Eigenschaften zugeschrieben werden (Olivera Ortega et al., 1999; Rea et al., 2003).

Obwohl sich auf Ebene der Enzymaktivität eine signifikante Hemmung sowohl der Arginase als auch der iNOS zeigte (Abb. 14 bzw. 15), nahm AA keinen Einfluss auf die GM-CSF-

induzierte mRNA-Synthese der beiden Enzyme (Abb. 21 bzw. 27). Weder nach 5h noch nach 20h Inkubation konnte eine Abnahme der Arginase I-mRNA beobachtet werden. In diesem Zeitraum sollten sich Veränderungen der Genexpression auf Ebene der mRNA bemerkbar machen. Dennoch muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der gewählte Versuchsaufbau nicht geeignet ist, die Wirkung von AA aufzuzeichnen. Da ausschließlich die Menge an synthetisierter mRNA untersucht wurde, lässt sich nicht beurteilen, ob AA tatsächlich Einfluss auf den Grad der Histonacetylierung im Bereich des Arginase I-Gens nimmt. Der tatsächliche Acetylierungsstatus der Histone wurde in diesem Setting nicht bestimmt. Einerseits ist es vorstellbar, dass eine p300-vermittelte Histonacetylierung für die Expression der Arginase I nicht von Bedeutung ist. Andererseits könnte eine eventuelle Reduktion der Histonacetylierung in diesem Fall ohne Konsequenz für die Induktion des Gens bleiben. Dennoch lässt sich feststellen, dass in diesem Setup eine relevante Beteiligung der HATs an der Induktion sowohl der Arginase I als auch der iNOS nicht beobachtet wurde. Die Divergenz der Ergebnisse auf Ebene der mRNA-Synthese und denen auf Ebene der Enzymaktivität lässt sich nicht abschließend erklären. Im Rahmen der 20-stündigen Inkubation in Gegenwart von GM-CSF und AA zeigte sich eine signifikante Hemmung der Arginase-Aktivität im Vergleich zu dem Ansatz mit GM-CSF alleine (Abb. 14). Dies deutet auf eine Beteiligung der HATs an der GM-CSF-vermittelten Induktion des Gens hin. Andererseits sind in der Literatur auch wiederholt direkte Enzym-Interaktionen durch AA beschrieben. So wirkt AA hemmend u.a. auf Xanthin-Oxidase (Masuoka und Kubo, 2004), Cyclooxygenase (Paramashivappa et al., 2003) und Phosphodiesterase 5 (Paramashivappa et al., 2002). Prinzipiell wäre also auch eine direkte Hemmung der GM-CSF-induzierten Arginase I- und der iNOS-Aktivitäten durch AA in Betracht zu ziehen. Letztlich kann auch ein unspezifischer, zytotoxischer Effekt der AA auf die Alveolarmakrophagen nicht ausgeschlossen werden.

Kürzlich konnten Sung et al. weitere Wirkmechanismen von AA beschreiben (Sung et al., 2008). Demnach beruht die antiinflammatorische Wirkung neben einer relativ unspezifischen Blockade der zellulären HAT-Aktivität vor allem auf einer Unterdrückung der Aktivierung von NF- κ B durch proinflammatorische Zytokine. Dies geschieht durch Hemmung der I- κ B α -Kinase, sodass eine Dissoziation der inhibierenden Untereinheit I- κ B α ausbleibt. Dieser neu beschriebene Effekt greift an einem früheren Punkt in die Signaltransduktion proinflammatorischer Zytokine ein. Dennoch bewirkt AA auch unter diesen Umständen eine Hemmung der NF- κ B-vermittelten Genexpression, sodass die vorliegenden Versuche geeignet sind, einen AA-Effekt auf mRNA-Ebene abzubilden.

Zudem konnten aktuelle Untersuchungen zeigen, dass in Lymphozyten STAT5-abhängige Gentranskription an die Aktivität von HDAC gebunden ist (Xu et al., 2003; Rascle et al., 2003). Dieser Mechanismus wurde kürzlich auch für die GM-CSF-induzierte Transkription einzelner Gene in murinen Makrophagen bestätigt (Sebastian et al., 2008). Die Steuerung der Gentranskription durch Modifikationen des Chromatins erweist sich also als wesentlich komplexer, als bisher angenommen.

II. GM-CSF-Effekt auf Arginase I und iNOS: funktionelle Bedeutung

Das multifunktionale Zytokin GM-CSF spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung der angeborenen Immunität. Speziell für die Differenzierung und Aktivierung von Alveolarmakrophagen ist GM-CSF von zentraler Bedeutung (Shibata et al., 2001). Im Gegensatz zu praktisch allen anderen Geweben benötigt die Lunge eine gewisse basale GM-CSF-Aktivität zur Aufrechterhaltung der pulmonalen Homöostase schon unter physiologischen Bedingungen (Uchida et al., 2004).

Wie in der Einleitung beschrieben, initiiert GM-CSF in der Lunge die angeborene Immunreaktion als Antwort auf eindringende Pathogene. Hier stehen die Alveolarmakrophagen im Vordergrund, die durch GM-CSF aktiviert werden, und so ihr volles zytotoxisches Potential erreichen (Armitage, 1998). Eine unzureichende Stimulation durch GM-CSF in Gegenwart eindringender Pathogene äußert sich regelmäßig in einer eingeschränkten Fähigkeit des Wirtsorganismus, diese Infektionen zu kontrollieren (LeVine et al., 1999).

II.1 GM-CSF-vermittelte Induktion der iNOS

Einen der Mechanismen, durch die GM-CSF die Alveolarmakrophagen befähigt, eindringende Pathogene zu eliminieren, stellt dabei die Induktion der iNOS dar. Eine erhöhte Aktivität der iNOS lässt sich in vielen Infektionen und Entzündungsreaktionen nachweisen. Die unspezifische zytotoxische Wirkung der Stickstoffradikale ermöglicht es dem angeborenen Immunsystem schnell auf eine Vielzahl unterschiedlichster Pathogene zu reagieren.

Dass eine inadäquate Expression der iNOS bei Infektionen die zytotoxische Kapazität des Wirtsorganismus beeinträchtigt, ist wiederholt beschrieben worden. Knockout-Mäuse, denen das iNOS-Gen fehlt, leiden unter einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Krankheitserregern, darunter *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* (Nathan und Shiloh, 2000). In experimentellen Salmonelleninfektionen dieser Mäuse zeigte

sich eine zeitlich differenzierte Produktion von Sauerstoffradikalen und Stickstoffradikalen. Die Sauerstoffradikale werden speziell in der frühen Phase der Wirtsreaktion gebildet, während die Stickstoffradikale sowohl in der frühen als auch in der späten Phase der antibakteriellen Reaktion nachweisbar sind (Vazquez-Torres et al., 2000; Mastroeni et al., 2000). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die initiale, stark zytotoxische Bildung von Sauerstoff- sowie Stickstoffradikalen zu einer schnellen Reduktion der Bakterienzahl führt. Die anschließende, längere Zeit anhaltende Synthese von Stickstoffradikalen durch iNOS wäre in diesem Fall geeignet, die Replikation verbleibender Bakterien so lange zu verzögern, bis diese durch Mechanismen des spezifischen Immunsystems endgültig beseitigt werden.

In diesem Zusammenhang kommt Stickstoffradikalen auch eine spezielle Bedeutung in der Kontrolle latenter Infektionen zu. So konnte z.B. gezeigt werden, dass NO die Vermehrung von Mycobakterien inhibiert und dadurch eine Aktivierung der Tuberkulose verhindert (Voskuil et al., 2003). Auch GM-CSF ist für die Kontrolle der pulmonalen Tuberkulose unabdinglich, wie Versuche mit GM-CSF-knock-out-Mäusen zeigen konnten (Gonzalez-Juarrero et al., 2005). Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte Fähigkeit des Zytokins, in Alveolarmakrophagen iNOS als effektiven zytotoxischen Effektor zu induzieren (Abb. 4, 25), dürfte hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

II.2 GM-CSF-vermittelte Induktion der Arginase I

Ratten-Alveolarmakrophagen exprimieren sowohl unter Ruhebedingungen als auch nach Stimulation durch geeignete Induktoren Arginase I. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass GM-CSF ein solcher Induktor der Arginase I ist (Abb. 3, 19). Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen kommen der Arginase verschiedene (patho-) physiologische Aufgaben zu. Bereits in den 1970er Jahren wurde vermutet, dass die in aktivierten Makrophagen synthetisierte Arginase als zytotoxisches Effektormolekül in der Abwehr vielfältiger Pathogene fungiert (Currie et al., 1979; Nathan, 1987). Kürzlich wurde in humanen Granulozyten ein konkreter Mechanismus für die zytotoxische Wirkung der Arginase nachgewiesen. Das Enzym konnte hierbei in den Granula neutrophiler Granulozyten lokalisiert werden, so dass es nach Phagozytose von Pathogenen in den Phagosomen sein Wirkung entfaltet und so durch Arginin-Entzug zur fungiziden Aktivität gegenüber *Candida albicans* beiträgt (Munder et al., 2005).

Eine wichtigere Funktion der Arginase als die des Substratentzuges für pathogene Keime stellt aber wohl die Regulation der NO-Synthese durch die iNOS dar. Wie in der Einleitung

beschrieben, konkurrieren bei gleichzeitiger Expression beide Enzyme um das gemeinsame Substrat L-Arginin. Durch Substratentzug wirkt die Arginase dabei limitierend auf die NO-Synthese der Makrophagen. In aktivierten Makrophagen wurde demonstriert, dass eine erhöhte Arginase-Aktivität zu einer Abnahme der NO-Produktion und damit einhergehend auch zu einer Abschwächung der zytotoxischen Antwort auf eindringende Pathogene führte (Hey et al., 1997; Modolell et al., 1995; Wang et al., 1995). Da eine lang anhaltende NO-Produktion auch schädlich für die Makrophagen und das umliegende Gewebe ist, könnte es unter diesen Bedingungen eine Aufgabe der Arginase sein, die NO-Synthese zu limitieren. Hierzu passt die Beobachtung, dass nach Stimulation der Alveolarmakrophagen durch LPS die Arginase-Aktivität mit einer zeitlichen Verzögerung einsetzt, während die Aktivität der iNOS sehr früh ansteigt (Sonoki et al., 1997; Klasen et al., 2001). Somit kommt es nach der, im Rahmen der Infektabwehr anfänglich erwünschten, starken Zunahme der NO-Synthese zu einer anschließenden Reduktion der Synthese von Stickstoffradikalen um den zytotoxischen Effekt auf körpereigene Zellen in Grenzen zu halten.

Neben der regulatorischen Funktion im NO-Stoffwechsel steuert die Arginase durch ihr Produkt Ornithin auch weit reichende anabole Prozesse. Wie in der Einleitung beschrieben, stellt Ornithin den Ausgangspunkt für die Synthese von L-Prolin dar. L-Prolin wiederum ist eine essentielle Komponente des Kollagens und anderer strukturbildender Proteine. Eine vermehrte Ornithin-Synthese nach Induktion der Arginase durch GM-CSF könnte somit beteiligt sein an biosynthetischen Prozessen z.B. im Rahmen der Wundheilung. Tatsächlich konnte in einem murinen Modell zur Angiogenese nach Arterienverschluß demonstriert werden, dass in Makrophagen nach Stimulation durch GM-CSF sowohl die Expression als auch die Aktivität der Arginase I erhöht sind, und dass dies mit einer gesteigerten L-Prolin-Synthese einher geht (Jost et al., 2003).

Alternativ geht Ornithin in die Synthese von Polyaminen wie Spermidin, Spermin und Putrescin ein. Polyamine steuern grundlegende zelluläre Prozesse wie Wachstum und Proliferation. Daher stellt die Induktion der Arginase durch GM-CSF einen möglichen Mechanismus dar, über den die Regeneration und Zellproliferation im Rahmen der Wundheilung gesteuert wird.

II.3 Koexpression von Arginase und iNOS durch GM-CSF bei Asthma bronchiale

Dass Arginase im allergischen Asthma verstärkt exprimiert wird, konnte in eine Reihe von Tiermodellen gezeigt werden. In diesen Modellen werden Tiere auf ein Antigen, z.B. Ovalbumin, durch intraperitoneale Injektion sensibilisiert, um im Anschluss mittels eines inhalati-

ven Antigens provoziert zu werden (Lloyd et al., 2001). So zeigte sich, dass die Arginase-Aktivität sowohl nach der frühen als auch der späten asthmatischen Reaktion nach Ovalbumin-Stimulation in einem Asthmodell in Meerschweinchen erhöht ist (Meurs et al., 2003). Zimmermann et al. konnten in BALB/c Mäusen nach Provokation mit Ovalbumin oder *Aspergillus fumigatus* eine starke Steigerung der Expression des Gens für Arginase I und in geringerem Maße auch für Arginase II nachweisen (Zimmermann et al., 2003). Abe et al. demonstrierten eine verstärkte Arginase-Expression auch in RAM nach Stimulation mit Ovalbumin (Abe et al., 2006). Kürzlich konnte in einer Untersuchung zu Th₂-vermittelten Lungenerkrankungen in fünf verschiedenen Mausmodellen Arginase I als eines von 26 Gentranskripten identifiziert werden, die regelmäßig verstärkt exprimiert werden (Lewis et al., 2008). Immunhistochemisch konnten dabei Makrophagen als die Hauptquelle des Enzyms identifiziert werden (Zimmermann et al., 2003; Takemoto et al., 2007). Eine Zunahme der Arginase-Expression ging in diesen Fällen auch einher mit einer Zunahme der Aktivität des Enzyms in der Lunge.

Wie bereits beschrieben, lässt sich NO unter physiologischen Bedingungen in der Atemluft nachweisen (Gustafsson et al., 1991). Bei Asthmatikern ist die Menge des abgeatmeten NO deutlich erhöht (Kharitonov et al., 1994) und korreliert mit dem Ausmaß der bronchialen Hyperreaktivität (Jatakanon et al., 1998) und Obstruktion (Lim et al., 1999). Eine Induktion der iNOS lässt sich beim Asthma vor allem nach der späten asthmatischen Reaktion nachweisen (Kharitonov et al., 1995b; Yan et al., 1995). Diese übermäßige NO-Produktion während der späten asthmatischen Reaktion bewirkt neben einer (durchaus erwünschten) Bronchodilatation auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität, Dyskrinie, Infiltration durch Entzündungszellen, Epithelschädigung und eine Unterhaltung der Th₂-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion (Schuiling et al., 1998; Ricciardolo, 2003). Ein Teil dieser deletären Effekte scheint statt auf NO selbst vielmehr auf dem stabileren und hoch reaktiven Peroxynitrit zu beruhen, dass aus der Reaktion von NO mit Superoxidanionen hervorgeht (Huie und Padmaja, 1993). Das stark zytotoxische Peroxynitrit führt durch Nitrierung zu DNA-Schädigung, Störung der mitochondrialen Atmung und Proteindysfunktion (Ricciardolo et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass iNOS in Gegenwart niedriger L-Arginin-Konzentrationen in der Lage ist, neben NO auch O²⁻ zu produzieren (Xia et al., 1998). Diese Reaktion wird durch die Reduktase-Domäne der iNOS in Gegenwart von NADPH katalysiert. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass nach exogener Zufuhr von L-Arginin in diesem Modell die NO-Synthese ansteigt, während die Konzentration von O²⁻ -und damit die von Peroxynitrit- abfällt (Xia und Zweier, 1997). Die parallele Synthese von NO und O²⁻ durch iNOS in Gegenwart

erniedrigter L-Arginin-Konzentrationen würde aktivierten Makrophagen eine effiziente Produktion von Peroxynitrit ermöglichen, ein Mechanismus der im Rahmen der Immunaktivierung mit einer gesteigerten zytotoxischen Kapazität einhergeht.

Die pulmonale NO-Produktion ist abhängig von einem ausreichenden Angebot an L-Arginin. So steigt die expiratorische NO-Konzentration gesunder Probanden nach oraler und inhalativer Zufuhr von L-Arginin an (Kharitonov et al., 1995a; Sapienza et al., 1998). Diese Zunahme der NO-Synthese geht einher mit einer abgeschwächten bronchialen Antwort auf Methacholin-Provokation in Trachea-Präparationen von Meerschweinchen, ein Effekt, der vermutlich auf einer erhöhten cNOS-vermittelten NO-Produktion beruht (Boer et al., 1999). Zusätzlich führt die Zugabe von L-Arginin zu einer iNANC-vermittelten Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege auf Grund verstärkter NO-Produktion durch nNOS (Maarsingh et al., 2005). Beide Ergebnisse demonstrieren einen bronchoprotektiven Effekt von NO.

Gleichzeitig führt ein verringertes Angebot von L-Arginin zu einer verminderten NO-Synthese und einer Zunahme der Atemwegsreaktivität. Dieser Mangel an L-Arginin kann zum einen aus einer verminderten intrazellulären Aufnahme der Aminosäure resultieren (Hammermann et al., 1999). Zum anderen besteht eine mögliche Regulation der NO-Synthese in der bevorzugten Verwertung des gemeinsamen Substrates durch die Arginase. Versuche mit dem spezifischen Arginase-Inhibitor N^o-Hydroxy-nor-L-Arginin zeigten unter Blockade der Arginase eine verstärkte NO-Produktion durch cNOS, was zu einer verminderten Bronchokonstriktion und vermehrter Relaxation der glatten Muskulatur in Trachea-Präparationen führte (Maarsingh et al., 2005; Meurs et al., 2000). Hieraus lässt sich ableiten, dass eine erhöhte Arginase-Aktivität durch Substratzug zu einer Hemmung der NO-Synthese durch die beiden cNOS führt. Die hieraus resultierende verstärkte bronchiale Hyperreaktivität lässt darauf schließen, dass eine Überexpression der Arginase im Rahmen des Asthma bronchiale ursächlich an Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation beteiligt ist.

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass GM-CSF in RAM sowohl Arginase I als auch iNOS induziert. Im Rahmen einer chronischen Aktivierung des Immunsystems ergibt sich hieraus eine Konstellation, die zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Atemwege führt. Zum einen führt der L-Arginin-Mangel aufgrund erhöhter Arginase-Aktivität zu einer gesteigerten Synthese des zytotoxischen Peroxynitrits durch die iNOS. Zum anderen fehlt das Substrat L-Arginin auch den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen, deren NO-Produktion eine wesentliche bronchoprotektive Funktion erfüllt. Gemeinsam führen diese Veränderungen zu einer anhaltenden bronchialen Hyperreaktivität. Des Weiteren resultiert eine langfristige

Induktion der Arginase in einer vermehrten Synthese von L-Ornithin, dem Ausgangspunkt für die Synthese sowohl von L-Prolin als auch von Polyaminen. Die resultierende gesteigerte Kollagensynthese führt zur Zunahme der extrazellulären Matrix und trägt zur Ausbildung der subepithelialen Fibrose bei, die in den Atemwegen von Asthmatikern beobachtet wird. Parallel induzieren Polyamine Zellproliferation und eine Hyperplasie von glatter Muskulatur und Becherzellen in der Bronchialwand. Somit muss davon ausgegangen werden, dass der anhaltenden Induktion der Arginase durch GM-CSF und weitere Mediatoren eine zentrale Rolle im Remodeling der Atemwege im Rahmen des Asthma bronchiale zukommt.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Der induzierbaren NO-Synthase dient L-Arginin als Substrat für die Synthese großer Mengen des zytotoxischen Stickstoffmonoxids im Rahmen der unspezifischen Immunität gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen. Die Arginase hingegen verstoffwechselt L-Arginin zu L-Ornithin, dem Ausgangspunkt für die Synthese von L-Prolin und somit von Kollagen und alternativ für die Synthese von Polyaminen als Regulatoren von Proliferationsprozessen.

Das multifunktionale Zytokin GM-CSF ist ein zentraler Regulator der Granulozyten- und Makrophagen-Linien und speziell in der Lunge ein wesentlichen Mediator der Immunaktivierung im Rahmen der unspezifischen Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen. Eine verstärkte Expression von GM-CSF als Reaktion auf diverse Aeroallergene scheint jedoch eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma zu spielen.

Vor diesem Hintergrund stand die Charakterisierung des Effektes von GM-CSF auf Arginase I und iNOS in Alveolarmakrophagen im Blickpunkt der vorliegenden Arbeit. Hierzu wurden primäre Alveolarmakrophagen der Ratte in Gegenwart von GM-CSF inkubiert und der Effekt auf die Expression sowie die Aktivität beider Enzyme mittels RT-PCR bzw. Enzym-Assays bewertet.

Bereits in unstimulierten Alveolarmakrophagen ließ sich auf funktioneller Ebene eine basale Aktivität sowohl der Arginase I als auch der iNOS beobachten. Inkubation mit GM-CSF führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Arginase-Aktivität vergleichbar mit der unter Stimulation durch LPS. Ebenso vermochte GM-CSF die Aktivität der iNOS zu steigern, gleichwohl das Ausmaß der Induktion deutlich geringer ausfiel als nach Stimulation durch LPS.

Die Unterdrückung des GM-CSF-Effekts auf die Aktivität beider Enzyme durch Dexamethason sowie PTLD und TLCK belegt eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der intrazellulären Signaltransduktion nach Aktivierung des GM-CSF-Rezeptors. Die Hemmung der GM-CSF-induzierten iNOS-Expression durch Dexamethason ließ sich auch auf Ebene der mRNA-Synthese bestätigen. Im Gegensatz dazu konnte eine Unterdrückung der Arginase I-Expression durch Dexamethason nicht beobachtet werden.

Um zu prüfen, in wie weit Histon-Acetyl-Transferasen an der GM-CSF-induzierten Gentranskription beteiligt sind, wurden RAM in Gegenwart von GM-CSF und dem globalen HAT-Inhibitor Anacardic Acid inkubiert. In dieser Konstellation zeigte sich ein signifikanter

Rückgang der Aktivität beider Enzyme. Überraschender Weise ließ sich dieser Effekt jedoch nicht auf Ebene der Gentranskription beobachten. Möglicherweise war der Versuchsaufbau nicht geeignet, einen eventuellen Anacardic Acid-Effekt aufzuzeigen. Ebenso wenig auszuschließen ist allerdings auch ein posttranskriptioneller bzw. posttranslationaler Ansatzpunkt der Anacardic Acid. Weiterführende Versuchsreihen zum Acetylierungsstatus der beiden Gen-Loci sind notwendig, um die Bedeutung der Histon-Acetyl-Transferasen für die Transkription der Arginase I und iNOS näher zu beschreiben.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass GM-CSF in Alveolarmakrophagen der Ratte die beiden Enzyme Arginase I und iNOS parallel zu induzieren vermag. In dieser Konstellation ist anzunehmen, dass in der Lunge zum einen vermehrt das zytotoxische Stickstoffradikal Peroxynitrit gebildet wird. Parallel dazu sollte durch Arginase I die Synthese von Kollagen sowie von Polyaminen, und dadurch bedingt das Remodeling der Atemwege im Rahmen des Asthma bronchiale induziert werden. Der durch die beiden Enzyme vermittelte Effekt von GM-CSF auf Kollagensynthese und Zellproliferation in den Atemwegen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, stellt aber einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Versuchsreihen dar.

G. LITERATURVERZEICHNIS

Abe M, Hayashi Y, Murai A, Shibata K, Sakata N, Igarashi R, et al. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibitors on asthma depending on administration schedule. *Free Radic Biol Med* 2006 Mar 15;40:1083-1095.

Akagawa KS, Kamoshita K, Tokunaga T. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating factor-1 on the proliferation and differentiation of murine alveolar macrophages. *J Immunol* 1988 Nov 15;141:3383-3390.

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964 May;51:786-794.

Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998 Dec 15;92:4491-4508.

Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Oct 11;91:10089-10093.

Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem* 2003 May 23;278:19134-19140.

Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001 Jan;107:3-6.

Bandaletova T, Brouet I, Bartsch H, Sugimura T, Esumi H, Ohshima H. Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. *APMIS* 1993 Apr;101:330-336.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997 Apr 10;336:1066-1071.

Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Sep;87:6934-6938.

Beliveau CG, Cheung CW, Cohen NS, Brusilow S, Raijman L. Regulation of urea and citrulline synthesis under physiological conditions. *Biochem J* 1993 May 15;292:241-247.

Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992 Jan 14;210:221-222.

Boer J, Duyvendak M, Schuurman FE, Pouw FM, Zaagsma J, Meurs H. 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* 1999 Nov;128:1114-1120.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 May;161:1720-1745.

Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 1995 Aug 15;155:2077-2084.

Bozinovski S, Jones J, Beavitt SJ, Cook AD, Hamilton JA, Anderson GP. Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 Apr;286:L877-L885.

Bozinovski S, Jones JE, Vlahos R, Hamilton JA, Anderson GP. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappa B and AP-1 in vivo. *J Biol Chem* 2002 Nov 8;277:42808-42814.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jan;87:682-685.

Brizzi MF, Aronica MG, Rosso A, Bagnara GP, Yarden Y, Pegoraro L. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1996 Feb 16;271:3562-3567.

Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 1996 Mar 22;84:843-851.

Burgess AW, Metcalf D. Serum half-life and organ distribution of radiolabeled colony stimulating factor in mice. *Exp Hematol* 1977 Nov;5:456-464.

Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004 Apr;81 Suppl 1:S38-S44.

Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994 Mar 4;269:6765-6772.

Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, et al. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001 Feb;1:85-93.

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992 Aug 1;176:599-604.

Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998 Jul;41:1141-1151.

Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Jan 17;206:667-673.

Cosio BG, Mann B, Ito K, Jazrawi E, Barnes PJ, Chung KF, et al. Histone acetylase and deacetylase activity in alveolar macrophages and blood monocytes in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 Jul 15;170:141-147.

- Currie GA. Activated macrophages kill tumour cells by releasing arginase. *Nature* 1978 Jun 29;273:758-759.
- Currie GA, Gyure L, Cifuentes L. Microenvironmental arginine depletion by macrophages in vivo. *Br J Cancer* 1979 Jun;39:613-620.
- de Boer J, Meurs H, Flendrig L, Koopal M, Zaagsma J. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 2001 Aug;133:1235-1242.
- de Gouw HW, Grunberg K, Schot R, Kroes AC, Dick EC, Sterk PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1998 Jan;11:126-132.
- de Groot RP, Coffey PJ, Koenderman L. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal* 1998 Oct;10:619-628.
- De Groote MA, Fang FC. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis* 1995 Oct;21 Suppl 2:S162-S165.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 May 10;91:4214-4218.
- DiRosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Nov 15;172:1246-1252.
- Dostert A, Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 2004;10:2807-2816.
- Dun NJ, Dun SL, Forstermann U, Tseng LF. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1992 Dec 7;147:217-220.
- Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Forstermann U. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci Lett* 1993 Aug 6;158:51-54.
- Dziedziczko A, Palgan K. [Eosinophil apoptosis and asthma]. *Pol Merkur Lekarski* 2004 Jul;17:73-75.
- Eberhardt W, Kunz D, Hummel R, Pfeilschifter J. Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Jun 25;223:752-756.
- Ebner K, Bandion A, Binder BR, de MR, Schmid JA. GM-CSF activates NF-kappaB via direct interaction of the GM-CSF receptor with IkappaB kinase beta. *Blood* 2003 Jul 1;102:192-199.
- Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2004 Oct;2:820-832.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996 Apr 5;272:50-53.

Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003 Jan 23;421:448-453.

Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev Immunol* 2005;25:405-428.

Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 1995 Oct 26;50:1321-1332.

Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Mar 1;88:1788-1792.

Fujisawa H, Ogura T, Kurashima Y, Yokoyama T, Yamashita J, Esumi H. Expression of two types of nitric oxide synthase mRNA in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 1994 Jul;63:140-145.

Gajewska BU, Wiley RE, Jordana M. GM-CSF and dendritic cells in allergic airway inflammation: basic mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003 Dec;2:279-292.

Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991 Mar 15;77:1131-1145.

Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998 Mar;17:7-23.

Ghosh DK, Stuehr DJ. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 1995 Jan 24;34:801-807.

Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995 Jul 27;333:214-221.

Gilbert RS, Herschman HR. "Macrophage" nitric oxide synthase is a glucocorticoid-inhibitable primary response gene in 3T3 cells. *J Cell Physiol* 1993 Oct;157:128-132.

Gonzalez-Juarrero M, Hattle JM, Izzo A, Junqueira-Kipnis AP, Shim TS, Trapnell BC, et al. Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Leukoc Biol* 2005 Jun;77:914-922.

Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Apr 17a;233:487-491.

Gotoh T, Chowdhury S, Takiguchi M, Mori M. The glucocorticoid-responsive gene cascade. Activation of the rat arginase gene through induction of C/EBPbeta. *J Biol Chem* 1997 Feb 7b;272:3694-3698.

Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction

with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett* 1996 Oct 21;395:119-122.

Granger DL, Hibbs JB, Jr., Perfect JR, Durack DT. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* 1990 Jan;85:264-273.

Gray MJ, Poljakovic M, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr. Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta. *Gene* 2005 Jun 20;353:98-106.

Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995;57:707-736.

Grody WW, Argyle C, Kern RM, Dizikes GJ, Spector EB, Strickland AD, et al. Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia. Enzymatic, pathologic, and molecular analysis. *J Clin Invest* 1989 Feb;83:602-609.

Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD. Human arginase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1987;13:181-214.

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 15;92:7809-7813.

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Dec 16;181:852-857.

Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 1998;16:301-313.

Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004 Dec;22:225-231.

Hammermann R, Hirschmann J, Hey C, Mossner J, Folkerts G, Nijkamp FP, et al. 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* 1999 Aug;21:155-162.

Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Nov;158:1585-1592.

Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Racke K. Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 1995 Feb 13;359:251-254.

Hendzel MJ, Kruhlak MJ, Bazett-Jones DP. Organization of highly acetylated chromatin around sites of heterogeneous nuclear RNA accumulation. *Mol Biol Cell* 1998 Sep;9:2491-2507.

Herzfeld A, Raper SM. The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem J* 1976 Feb 1;153:469-478.

Hey C, Boucher JL, Vadon-Le GS, Ketterer G, Wessler I, Racke K. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1997 Jun;121:395-400.

Hey C, Wessler I, Racke K. Nitric oxide synthase activity is inducible in rat, but not rabbit alveolar macrophages, with a concomitant reduction in arginase activity. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995 Jun;351:651-659.

Hortelano S, Genaro AM, Bosca L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 1993 Apr 5;320:135-139.

Huffman Reed JA, Rice WR, Zsengeller ZK, Wert SE, Dranoff G, Whitsett JA. GM-CSF enhances lung growth and causes alveolar type II epithelial cell hyperplasia in transgenic mice. *Am J Physiol* 1997 Oct;273:L715-L725.

Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993;18:195-199.

Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000 Sep;20:6891-6903.

Ito K, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, et al. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Aug 1;166:392-396.

Janknecht R, Hunter T. Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr Biol* 1996 Aug 1;6:951-954.

Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998 Feb;53:91-95.

Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996 May;114:107-132.

Jones TC. The effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on macrophage function in microbial disease. *Med Oncol* 1996 Sep;13:141-147.

Jost MM, Ninci E, Meder B, Kempf C, Van RN, Hua J, et al. Divergent effects of GM-CSF and TGFbeta1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis. *FASEB J* 2003 Dec;17:2281-2283.

Kanyo ZF, Chen CY, Daghigh F, Ash DE, Christianson DW. Crystallization and oligomeric structure of rat liver arginase. *J Mol Biol* 1992 Apr 20;224:1175-1177.

Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, Christianson DW. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 1996 Oct 10;383:554-557.

Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998 May 15;93:487-490.

Katan-Khaykovich Y, Struhl K. Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev* 2002 Mar 15;16:743-752.

Kay AB, Ying S, Varney V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, et al. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 1991 Mar 1;173:775-778.

Kaysen GA, Strecker HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem J* 1973 Aug;133:779-788.

Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, Hjelm M, Barnes PJ. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin Sci (Lond)* 1995 Feb;88:135-139.

Kharitonov SA, O'connor BJ, Evans DJ, Barnes PJ. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Jun;151:1894-1899.

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994 Jan 15;343:133-135.

Kim H, Lee HS, Chang KT, Ko TH, Baek KJ, Kwon NS. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 1995 May 1;154:4741-4748.

Kim YM, Lee BS, Yi KY, Paik SG. Upstream NF-kappaB site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jul 30;236:655-660.

Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J, et al. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 2001 Mar;132:1349-1357.

Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Forstermann U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 1996 Jan;49:15-21.

Knight DA, Asokanathan N, Watkins DN, Misso NL, Thompson PJ, Stewart GA. Oncostatin M synergises with house dust mite proteases to induce the production of PGE(2) from cultured lung epithelial cells. *Br J Pharmacol* 2000 Oct;131:465-472.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994 Mar 1;298:249-528.

Koch A, Giembycz M, Ito K, Lim S, Jazrawi E, Barnes PJ, et al. Mitogen-activated protein kinase modulation of nuclear factor-kappaB-induced granulocyte macrophage-colony-stimulating factor release from human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004 Mar;30:342-349.

Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998 Aug;20:615-626.

LeVine AM, Reed JA, Kurak KE, Cianciolo E, Whitsett JA. GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. *J Clin Invest* 1999 Feb;103:563-569.

Lewis CC, Yang JY, Huang X, Banerjee SK, Blackburn MR, Baluk P, et al. Disease-specific gene expression profiling in multiple models of lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 Feb 15;177:376-387.

Lim S, Jatakanon A, John M, Gilbey T, O'connor BJ, Chung KF, et al. Effect of inhaled budesonide on lung function and airway inflammation. Assessment by various inflammatory markers in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 Jan;159:22-30.

Lindemann D, Racke K. 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* 2003 Dec;368:546-550.

Lloyd CM, Gonzalo JA, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Mouse models of allergic airway disease. *Adv Immunol* 2001;77:263-295.

Louis CA, Mody V, Henry WL, Jr., Reichner JS, Albina JE. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 1999 Jan;276:R237-R242.

Louis CA, Reichner JS, Henry WL, Jr., Mastrofrancesco B, Gotoh T, Mori M, et al. Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. *Am J Physiol* 1998 Mar;274:R775-R782.

Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Oct 15;90:9730-9734.

Maarsingh H, Leusink J, Bos IS, Zaagsma J, Meurs H. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respir Res* 2006;7:6.

Maarsingh H, Tio MA, Zaagsma J, Meurs H. Arginase attenuates inhibitory nonadrenergic noncholinergic nerve-induced nitric oxide generation and airway smooth muscle relaxation. *Respir Res* 2005;6:23.

Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992 Aug 20;358:676-678.

Marsden PA, Heng HH, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 1994 Jan 1;19:183-185.

Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993 Aug 15;268:17478-17488.

Martin TR. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 Aug;23:128-132.

- Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J Exp Med* 2000 Jul 17;192:237-248.
- Masuoka N, Kubo I. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochim Biophys Acta* 2004 Apr 5;1688:245-249.
- Mayer B, John M, Bohme E. Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 1990 Dec 17;277:215-219.
- McMillan K, Masters BS. Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* 1995 Mar 21;34:3686-3693.
- Meja KK, Seldon PM, Nasuhara Y, Ito K, Barnes PJ, Lindsay MA, et al. p38 MAP kinase and MKK-1 co-operate in the generation of GM-CSF from LPS-stimulated human monocytes by an NF-kappa B-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 2000 Nov;131:1143-1153.
- Meurs H, Hamer MA, Pethe S, Vadon-Le GS, Boucher JL, Zaagsma J. Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *Br J Pharmacol* 2000 Aug;130:1793-1798.
- Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 2003 Sep;24:450-455.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000 Jun 15;164:6166-6173.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995 Apr;25:1101-1104.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43:109-142.
- Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 1992;12:81-101.
- Morris SM, Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* 2006 Feb;83:508S-512S.
- Morris SM, Jr., Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D. Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 1997 Jul 9;193:157-161.
- Morris SM, Jr., Kepka-Lenhart D, Chen LC. Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am J Physiol* 1998 Nov;275:E740-E747.
- Mossner J, Hammermann R, Racke K. Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:297-305.

Mui AL, Wakao H, Harada N, O'Farrell AM, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 transduce signals through two forms of STAT5. *J Leukoc Biol* 1995 May;57:799-803.

Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998 Jun 1;160:5347-5354.

Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 1999 Oct 1;163:3771-3777.

Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005 Mar 15;105:2549-2556.

Murphy JM, Young IG. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam Horm* 2006;74:1-30.

Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993 Jan 25;316:175-180.

Nakata K, Akagawa KS, Fukayama M, Hayashi Y, Kadokura M, Tokunaga T. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes the proliferation of human alveolar macrophages in vitro. *J Immunol* 1991 Aug 15;147:1266-1272.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992 Sep;6:3051-3064.

Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 1;97:8841-8848.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994 Sep 23;78:915-918.

Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987 Feb;79:319-326.

Nathan CF, Hibbs JB, Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991 Feb;3:65-70.

Nemeth A, Langst G. Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004 Feb;2:334-343.

Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 Feb 26;191:89-94.

Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, Griffen MM, Maley ME, Rockich AK, et al. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 2001 Mar;233:393-399.

Olivera Ortega AG, Soto HM, Martinez VM, Terrazas ST, Solares AF. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphiphterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J Ethnopharmacol* 1999 Dec 15;68:109-113.

Ouzounis CA, Kyrpides NC. Parallel origins of the nucleosome core and eukaryotic transcription from Archaea. *J Mol Evol* 1996 Feb;42:234-239.

Paramashivappa R, Phani KP, Subba Rao PV, Srinivasa RA. Synthesis of sildenafil analogues from anacardic acid and their phosphodiesterase-5 inhibition. *J Agric Food Chem* 2002 Dec 18;50:7709-7713.

Paramashivappa R, Phani KP, Subba Rao PV, Srinivasa RA. Design, synthesis and biological evaluation of benzimidazole/benzothiazole and benzoxazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2003 Feb 24;13:657-660.

Pauleau AL, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS, Murray PJ. Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* 2004 Jun 15;172:7565-7573.

Perozich J, Hempel J, Morris SM, Jr. Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochim Biophys Acta* 1998 Jan 15;1382:23-37.

Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994 Jan 15;343:146-147.

Pollock JS, Nakane M, Buttery LD, Martinez A, Springall D, Polak JM, et al. Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 1993 Nov;265:C1379-C1387.

Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, Baeuerle PA, Szelenyi S, Brune K, et al. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol* 2007 Feb 28;557:230-235.

Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 1998 Jul;275:L96-102.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Dec;87:10043-10047.

Rasclé A, Johnston JA, Amati B. Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. *Mol Cell Biol* 2003 Jun;23:4162-4173.

Rea AI, Schmidt JM, Setzer WN, Sibanda S, Taylor C, Gwebu ET. Cytotoxic activity of *Ozoroa insignis* from Zimbabwe. *Fitoterapia* 2003 Dec;74:732-735.

Reed JA, Ikegami M, Robb L, Begley CG, Ross G, Whitsett JA. Distinct changes in pulmonary surfactant homeostasis in common beta-chain- and GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Jun;278:L1164-L1171.

Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003 Feb;58:175-182.

- Ricciardolo FL, Di SA, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* 2006 Mar 8;533:240-252.
- Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004 Jul;84:731-765.
- Ricciardolo FL, Timmers MC, Geppetti P, van SA, Brahim JJ, Sont JK, et al. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Aug;108:198-204.
- Ritz SA, Stampfli MR, Davies DE, Holgate ST, Jordana M. On the generation of allergic airway diseases: from GM-CSF to Kyoto. *Trends Immunol* 2002 Aug;23:396-402.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001;70:81-120.
- Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 2001 Feb 15;166:2173-2177.
- Ryan JL, Yohe WB, Morrison DC. Stimulation of peritoneal cell arginase by bacterial lipopolysaccharides. *Am J Pathol* 1980 May;99:451-462.
- Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. 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* 1998 Aug;12:929-937.
- Salimuddin, Nagasaki A, Gotoh T, Isobe H, Mori M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1999 Jul;277:E110-E117.
- Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991 Oct 7;291:145-149.
- Sapienza MA, Kharitonov SA, Horvath I, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled L-arginine on exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1998 Mar;53:172-175.
- Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 1992 Oct;40:1439-1456.
- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jan 15;88:365-369.
- Schrell A, It-Moerbe J, Lanz T, Schroeder J. Arginase of *Agrobacterium Ti* plasmid C58. DNA sequence, properties, and comparison with eucaryotic enzymes. *Eur J Biochem* 1989 Oct 1;184:635-641.

Schuiling M, Meurs H, Zuidhof AB, Venema N, Zaagsma J. Dual action of iNOS-derived nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Nov;158:1442-1449.

Scolnick LR, Kanyo ZF, Cavalli RC, Ash DE, Christianson DW. Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry* 1997 Aug 26;36:10558-10565.

Sebastian C, Serra M, Yeramian A, Serrat N, Lloberas J, Celada A. Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells. *J Immunol* 2008 May 1;180:5898-5906.

Sharkhuu T, Matthaei KI, Forbes E, Mahalingam S, Hogan SP, Hansbro PM, et al. Mechanism of interleukin-25 (IL-17E)-induced pulmonary inflammation and airways hyperreactivity. *Clin Exp Allergy* 2006 Dec;36:1575-1583.

Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 1994 Dec;94:2231-2236.

Sheridan JW, Metcalf D. A low molecular weight factor in lung-conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation in vitro. *J Cell Physiol* 1973 Feb;81:11-23.

Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM, Ignarro LJ. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 Mar 31;191:1301-1308.

Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001 Oct;15:557-567.

Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990 Feb;141:471-501.

Smith PD, Lamerson CL, Banks SM, Saini SS, Wahl LM, Calderone RA, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments human monocyte fungicidal activity for *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1990 May;161:999-1005.

Sonoki T, Nagasaki A, Gotoh T, Takiguchi M, Takeya M, Matsuzaki H, et al. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1997 Feb 7;272:3689-3693.

Southan GJ, Szabo C, Thiernemann C. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by spermine is modulated by aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Sep 30;203:1638-1644.

Spector EB, Rice SC, Cederbaum SD. Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. *Pediatr Res* 1983 Dec;17:941-944.

Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jun 7;91:5592-5596.

- Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000 Jun;64:435-459.
- Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999 May 5;1411:217-230.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Sep 1;88:7773-7777.
- Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Nov;82:7738-7742.
- Sun G, Stacey MA, Schmidt M, Mori L, Mattoli S. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol* 2001 Jul 15;167:1014-1021.
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Price BD. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett* 2006 Aug 7;580:4353-4356.
- Sung B, Pandey MK, Ahn KS, Yi T, Chaturvedi MM, Liu M, et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 2008 May 15;111:4880-4891.
- Takemoto K, Ogino K, Shibamori M, Gondo T, Hitomi Y, Takigawa T, et al. Transiently, paralleled upregulation of arginase and nitric oxide synthase and the effect of both enzymes on the pathology of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 Dec;293:L1419-L1426.
- Takiguchi M, Matsubasa T, Amaya Y, Mori M. Evolutionary aspects of urea cycle enzyme genes. *Bioessays* 1989 May;10:163-166.
- Takiguchi M, Mori M. Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochem J* 1995 Dec 15;312:649-659.
- Tarr PE. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the immune system. *Med Oncol* 1996 Sep;13:133-140.
- Terasaki K, Spector EB, Hendrickson R, Cederbaum SD. Properties of arginase from liver of *Macaca fascicularis*; comparison of normals with red blood cell arginase deficient monkeys. *Biochem Genet* 1980 Oct;18:829-841.
- Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Forstermann U. Identification of an endothelial-like type III NO synthase in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 1994 Jan;266:C22-C28.
- Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, et al. High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor acti-

- vity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 2004 Feb 1;103:1089-1098.
- Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999 Feb;11:19-22.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* 2000 Jul 17;192:227-236.
- Vignali M, Steger DJ, Neely KE, Workman JL. Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J* 2000 Jun 1;19:2629-2640.
- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999 Apr;103:563-573.
- Vockley JG, Jenkinson CP, Shukla H, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* 1996 Dec 1;38:118-123.
- Vodovotz Y, Kwon NS, Pospischil M, Manning J, Paik J, Nathan C. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994 Apr 15;152:4110-4118.
- Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* 2003 Sep 1;198:705-713.
- Wang WW, Jenkinson CP, Griscavage JM, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, et al. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 May 25;210:1009-1016.
- Wei LH, Jacobs AT, Morris SM, Jr., Ignarro LJ. 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* 2000 Jul;279:C248-C256.
- Welte T, Koch F, Schuler G, Lechner J, Doppler W, Heufler C. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a unique set of STAT factors in murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997 Oct;27:2737-2740.
- Williamson DJ, Begley CG, Vadas MA, Metcalf D. The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 1988 Apr;72:67-73.
- Wing EJ, Magee DM, Whiteside TL, Kaplan SS, Shadduck RK. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood* 1989 Feb 15;73:643-646.
- Woodcock JM, Bagley CJ, Lopez AF. The functional basis of granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptor activation, basic and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 Oct;31:1017-1025.

- Woolley KL, Adelroth E, Woolley MJ, Ellis R, Jordana M, O'Byrne PM. Effects of allergen challenge on eosinophils, eosinophil cationic protein, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Jun;151:1915-1924.
- Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 1998;67:545-579.
- Wu G. Urea synthesis in enterocytes of developing pigs. *Biochem J* 1995 Dec 15;312:717-723.
- Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998 Nov 15;336:1-17.
- Wu J, Grunstein M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* 2000 Dec;25:619-623.
- Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem* 1998 Aug 28;273:22635-22639.
- Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Jun 24;94:6954-6958.
- Xie Q. A novel lipopolysaccharide-response element contributes to induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997 Jun 6;272:14867-14872.
- Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 1994 Nov;56:576-582.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992 Apr 10;256:225-228.
- Xu M, Nie L, Kim SH, Sun XH. STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *EMBO J* 2003 Feb 17;22:893-904.
- Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM, Sanders KM. Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 1994 Sep;49:1-14.
- Yan ZQ, Hansson GK, Skoogh BE, Lotvall JO. Induction of nitric oxide synthase in a model of allergic occupational asthma. *Allergy* 1995 Sep;50:760-764.
- Yu H, Yoo PK, Aguirre CC, Tsoa RW, Kern RM, Grody WW, et al. Widespread expression of arginase I in mouse tissues. Biochemical and physiological implications. *J Histochem Cytochem* 2003 Sep;51:1151-1160.
- Zhang X, Laubach VE, Alley EW, Edwards KA, Sherman PA, Russell SW, et al. Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 1996 Apr;59:575-585.
- Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, et al. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 2003 Jun;111:1863-1874.

Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002 Apr;13:186-199.

Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest* 1986 Jun;77:1857-1863.

H. Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von LPS	48
2	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von LPS	49
3	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF	50
4	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF	51
5	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und LPS	52
6	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und LPS	53
7	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und GM-CSF	54
8	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von Dexamethason und GM-CSF	55
9	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von NF- κ B-Inhibitoren und GM-CSF	56
10	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von NF- κ B-Inhibitoren und GM-CSF	57
11	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von LPS und AA	59
12	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von LPS und AA	59
13	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von LPS und AA	60
14	Arginase-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF und AA	61
15	iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von GM-CSF und AA	62
16	Transkription der Arginase I unter dem Einfluss von LPS	64
17	Transkription der Arginase I unter dem Einfluss von LPS und Dexamethason	65
18	Transkription der Arginase I unter dem Einfluss von LPS und AA	66
19	Transkription der Arginase I unter dem Einfluss von GM-CSF	67
20	Transkription der Arginase I unter dem Einfluss von GM-CSF und Dexamethason	68
21	Transkription der Arginase I unter dem Einfluss von GM-CSF und AA	69
22	Transkription der iNOS unter dem Einfluss von LPS	70
23	Transkription der iNOS unter dem Einfluss von LPS und Dexamethason	71
24	Transkription der iNOS unter dem Einfluss von LPS und AA	72
25	Transkription der iNOS unter dem Einfluss von GM-CSF	73
26	Transkription der iNOS unter dem Einfluss von GM-CSF und Dexamethason	74
27	Transkription der iNOS unter dem Einfluss von GM-CSF und AA	75

I. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Kurt Racké, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren sowie für seine engagierte Unterstützung und seine Geduld sowohl in der Zeit der experimentellen Arbeit im Labor als auch in der langen Phase der Zusammenschrift meiner Dissertation.

Bei Frau Dr. Sonja Matthiesen bedanke ich mich herzlich für die intensive Betreuung in der Frühphase meines Projektes, für die Einarbeitung in die einzelnen Arbeitsmethoden und die ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung während der teils spannenden, teils mühseligen Zeiten der Laborarbeit.

Frau Dr. Mareille Warnken übernahm im weiteren Verlauf die Betreuung meiner Dissertation. Auch an sie geht ein herzlicher Dank für die moralische Unterstützung, die vielen anregenden Diskussionen und die Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Ich möchte mich zudem bei den technischen Assistentinnen, Rita Fuhrmann und Christina Stichnote, sowie den wechselnden DoktorandInnen meiner Arbeitsgruppe für ihre praktische Unterstützung und die durchweg gute Stimmung im Labor bedanken. Die wirklich wunderbare Arbeitsatmosphäre hat keinen unwesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Doktorarbeit geleistet.

Zuletzt bedanke ich mich vor allem bei meiner Mutter Anne und meiner Schwester Claudia sowie all meinen Freunden für die fürsorgliche Unterstützung und ihre unerlässliche Bereitschaft, sich während der vergangenen fünf Jahre meine Sorgen und Probleme anzuhören.