

**Untersuchung der Bedeutung von Lipopolysaccharid
Responsive Element AA (LRE_{AA}) und AP-1 für die
Regulation der Expression des kationischen
Aminosäure-Transporters CAT-2B in
Rattenalveolarmakrophagen**

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

vorgelegt von
Fritz Walter Horlbeck
aus *Jena*

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. K. Racké
2. Gutachter: Professor Dr. med. U. Juergens

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.7.2007

Aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Professor Dr. Alexander Pfeifer

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch
publiziert

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichniss	7
1. Einleitung	9
1.1. Überblick NO	9
1.2.1. Überblick NO-Synthasen	11
1.2.2. Struktur und Ko-Enzyme	12
1.2.3. Reaktionsmechanismus	12
1.2.4. Regulation	13
1.3. Überblick Arginin	16
1.4.1. Überblick Transportmechanismen für kationische Aminosäuren	18
1.4.2. Kationische Aminosäuretransporter (CATs)	19
1.5. Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Gewinnung und Kultur von Rattenalveolarmakrophagen	21
2.2. Protokoll für die Untersuchung von rc-jun und rc-fos	21
2.3. Protokoll für die Versuche mit Decoy-Desoxyoligonukleotiden	22
2.4. Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1. RNA-Präparation	22
2.4.1.1. RNA-Präparation mit dem Pröp.-Kit 7o von Sigma	23
2.4.1.2. RNA-Präparation mit dem Pröp.-Kit von Eppendorf	24
2.4.2. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	25
2.4.3. Omniscript RT-Reaktion	25
2.4.4. PCR	26
2.4.4.1. PCR mit Sigma Red Taq [®] im Stratagene-Robocycler	27
2.4.4.2. PCR mit Invitrogene [®] Taq-Polymerase	27
2.4.5. Elektrophorese im Agarosegel	27
2.5. Verwendete Software, Statistische Auswertung	28

2.6. Ansatz der verwendeten Medien und Lösungen	29
2.7. Liste der verwendeten Substanzen und Chemikalien	30
3.0. Ergebnisse	33
3.1. Untersuchung des rc-fos und rc-jun Gehaltes in LPS-aktivierten RAM in Abhängigkeit von der Zeit	33
3.1.1. Anstieg des mRNA-Gehaltes für rc-jun und rc-fos nach LPS-Stimulation	33
3.2. Untersuchung der Beeinflußbarkeit der Expression von iNOS, CAT 2B sowie Arginase 1 und 2 in LPS-stimulierten RAM durch Decoy-Desoxyoligonukleotide.	36
3.2.1. Einfluß von AP-1-Decoy-Desoxyoligonukleotiden (ODN)	37
3.2.1.1. 4 h Inkubation mit AP-1-ODN	37
3.2.1.2. 20 h Inkubation mit AP-1-ODN	40
3.2.2. Einfluß von LRE _{AA} -Decoy-Desoxyoligonukleotiden	43
3.2.2.1. 4 h Inkubation mit LRE _{AA} -ODN	43
3.2.2.2. 20 h Inkubation mit LRE _{AA} - und mLRE _{AA} -ODN	46
4.0. Diskussion	51
4.1. Zeitabhängige Stimulation der iNOS-Expression nach Stimulation mit LPS	51
4.2. Einflüsse durch LRE_{AA}-Decoy-Desoxyoligonukleotide	51
4.3. Beeinflussung der Genexpression durch AP-1-Decoy-Desoxyoligonukleotide	55
4.4. Schlußfolgerung	57
5.0. Zusammenfassung	58
6.0. Literaturverzeichnis	61

7.0. Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	aktivierendes Protein 1
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanidinmonophosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxynucleosidtriphosphat
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
GAS	γ -activating site
H ₂ O	Wasser
HMG I(Y)	high mobility group-Protein I(Y)
IFN	Interferon
I κ B- α	inhibitorisches Protein I κ B- α
JaK	Januskinase
Kt	Kontrolle
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
LRE _{AA}	LPS response element
mLRE _{AA}	modifiziertes LRE _{AA}
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NF- κ Bd	Nukleärer Faktor- κ B-Bindungsstelle
NHA	N-Hydroxy-Arginin
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS	NO-Synthase
Oct-1	octamer-like binding sequence 1
OD	optische Dichte
ODN	Decoy-Desoxyoligonukleotide
PCR	polymerase chain reaction
PBS	cold phosphate buffered saline
PKB (AKT)	Proteinkinase B
RACE-PCR	rapid amplification of cDNA ends

RAM	Rattenalveolarmakrophagen
rARG 1	Rattenarginase 1
rARG 2	Rattenarginase 2
rCAT-2B	rat cationic amino acid transporter 2B
rc-jun	Transkriptionsfaktor c-jun der Ratte
rc-fos	Transkriptionsfaktor c-fos der Ratte
riNOS	induzierbare Ratten-NO-Synthase
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	RNA-abbauende Enzyme, ubiquitär verbreitet
RT	Reverse Transkriptase
TLR 4	Toll-like Receptor 4
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha

1. Einleitung

1.1. Überblick NO

Bereits seit 1980 war die Existenz eines sogenannten "endothelium derived relaxation factor" (EDRF) bekannt (Furchgott und Zawadzki, 1980), doch erst 1987 identifizierten Ignarro et. al. diesen als Stickstoffmonoxid (NO). Es handelte sich hier um den ersten Nachweis, dass in Säugetierzellen ein Gas, eben jenes NO, als Botenstoff synthetisiert wird.

Wenig später wurde die proteinogene, kationische Aminosäure L-Arginin als einziges Substrat für die Bildung von NO erkannt (Schmidt et al., 1988). NO wird durch die Aktivität einer in 3 Isoformen vorliegenden NO-Synthase (NOS) unter gleichzeitiger Bildung von L-Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff (O₂) gebildet (Förstermann und Kleinert, 1995; Alderton et al., 2001).

In den folgenden Jahren wurde überaus zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen von NO im Organismus bekannt.

So wirkt NO nicht nur, wie der Name EDRF nahelegt, über die Bildung von cGMP dilatierend auf die Gefäßmuskulatur, sondern gleichartig auch auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes sowie der Bronchien und ist hier ein physiologischer Antagonist der cholinergen Bronchokonstriktion (Ward et al., 1993; Beck et al., 1999; Eskandari et al., 1999; Torihashi et al., 2000; Meurs et al., 2002).

Weiterhin fungiert NO als Transmitter nicht adrenerger, nicht cholinерger (NANC) Neuronen in Atemwegen und intestinalem Plexus myentericus und spielt eine Rolle als Regulator der Blutplättchenaggregation (Ward et al., 1993; Stark et al., 1993).

Des Weiteren rückte in den letzten Jahren neben einer interzellulären Botenfunktion von NO auch seine Funktion als intrazellulärer Botenstoff in das wissenschaftliche Interesse (Brunn et al., 1997). So konnten sowohl aktivierende als auch aktivitätsverringende Auswirkungen auf eine Reihe von an Signalkaskaden beteiligten Enzymen wie MAP-Kinasen, JAK's und PKC belegt

werden (Beck et al., 1999). Über diese Wege beeinflusst NO indirekt die Expression zahlreicher Gene.

Eine besonders wichtige Rolle spielt NO auch im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr gegen Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten und kanzerös entartete Körperzellen (Liew et al., 1997; Scott et al., 2001; Saxena et al., 2001; Alderton et al., 2001; Cerquetti et al., 2002).

Auf der einen Seite wirken NO und weitere, daraus entstehende radikale Stickstoffverbindungen wie Peroxynitrit (ONOO^-) als direkte Effektormoleküle in hohen Konzentrationen zytotoxisch, auf der anderen Seite besitzt NO auch eine immunmodulatorische Wirkung (Beck et al., 1999; Ricciardolo, 2003). Diskutiert wurde eine Hemmung von Th_1 -Zellen und den dazugehörigen Zytokinen IL-1 β und TNF-alpha und einer verstärkten Th_2 -Immunantwort (Munder et al.; 1998). Des Weiteren sind chemotaktische und proliferationsbeeinflussende Wirkungen auf Entzündungszellen dokumentiert (Albina et al., 1991; Munder et al., 1998; Moore et al., 2001).

In Kenntniss der hohen Bioreaktivität der entstehenden Stickstoffverbindungen wird verständlich, dass NO, im Übermaß synthetisiert, auch zu Schädigung von körpereigenen Zellen bis hin zur Apoptose führen kann (Beck et al., 1999).

Auch eine Vielzahl von Erkrankungen verschiedenster Organsysteme werden mit dem Stoffwechsel von NO in Verbindung gebracht.

Zu den gut untersuchten Organsystemen zählt der Respirationstrakt, wo NO eine Vielzahl von Wirkungen entfaltet. So führt NO neben einer Erhöhung der Zilienschlagfrequenz zu Broncho- und Vasodilatation (Jain et al., 1993; Ward et al., 1993; Ullrich et al., 1999) und ist somit maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Gefäß und Atemwegshomöostase beteiligt.

NO ist hier jedoch auch entscheidend an der Pathophysiologie so verschiedener Erkrankungen wie extrinsischem und intrinsischem Asthma, septischem Lungenversagen, chronischer Silikose und früher chronischer Lungenkrankheit beteiligt (Barnes und Liew, 1995; Schuiling et al., 1998; Silkoff et al., 2000; Trifilieff et al., 2000; Ricciardolo et al., 2001; Ricciardolo, 2003; Li et al., 2002).

Neben einer Beteiligung an Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, gramnegativen septischem Schock und Ileus, Kardiomyopathie und Reperfusionsschäden (Miyasaka et Hirata, 1997; Ullrich et al., 1999; del Zoppo et al., 2000) wird auch eine Beteiligung von NO bei der Entstehung gastrointestinaler Karzinome diskutiert. Bereits seit längerer Zeit ist chronische Entzündung als ein Risikofaktor der Tumorgenese bekannt. Erhöhte Karzinominzidenzen finden sich beispielsweise im Rahmen der chronischen Ösophagitis, Gastritis und Kolitis. Chronische Entzündung führt zu einem über größere Zeiträume vermehrten Anfall reaktiver Stickstoffverbindungen, die das antioxidative Potential der Zelle überfordern und durch direkte DNS-Schädigung bei gleichzeitiger Behinderung der enzymatischen Reparaturmechanismen zu einer Akkumulation von DNS-Schäden führen (Jaiswal et al., 2001; Kim et al., 2001). Diese, in Kombination mit einer Beeinflussung der zellulären Apoptosefähigkeit durch NO, können dann zu karzinomatöser Entartung führen (Jaiswal et al., 2001; Kim et al., 2001; Cerquetti et al., 2002; Srivastava et al., 2002; Xu et al., 2002).

Die Bedeutung der Signaltransduktion durch NO wurde 1998 mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin oder Physiologie an R. F. Furchgott, L. J. Ignarro und F. Murad gewürdigt (1).

1.2.1. Überblick NO-Synthasen

Es handelt sich bei den NO-Synthasen (NOS) um mindestens 3 Cytochrom-p450 verwandten Enzyme, welche von 3 chromosomal verschieden gelegenen und unterschiedlich regulierten Genen codiert werden (Alderton et al., 2001; Lamas et al., 1992), deren Expression spezie- und gewebespezifisch stark variiert.

Man teilt Sie in die konstitutiven, Ca^{2+} -abhängigen NOS1 (=nNOS) und NOS3 (=eNOS) sowie die induzierbare, Ca^{2+} -unabhängige NOS2 oder iNOS ein. Obwohl weiterführende Arbeiten die Eindeutigkeit dieser Einteilung stark

relativiert haben (Griscavage et al., 1993; Förstermann et al., 1998), hat sie starke Verbreitung gefunden und wird daher auch hier beibehalten. In jüngerer Zeit wurden zusätzlich verschiedene Splice-Varianten identifiziert (Förstermann et al., 1998).

Da die induzierbare NOS2 die vorherrschende Isoform in Ratten-Alveolarmakrophagen (RAM) ist und daher die höchste Relevanz für die vorliegende Arbeit besitzt, wird auf diese im folgenden detaillierter eingegangen.

1.2.2. Struktur und Ko-Enzyme

Das Ratten iNOS Gen umfaßt ca. 36kb auf Chromosom 10 und enthält 27 Exons (Keinanen et al., 1999). Es bestehen ausgeprägte Strukturhomologien mit dem humanen iNOS Gen (Chartrain et al., 1994) und den konstitutiven NOS.

Alle NOS liegen in ihrer aktiven Form als Homodimere vor, die außerdem 2 Moleküle Calmodulin (CaM) enthalten.

Die Enzymaktivität benötigt insgesamt 5 Ko-Enzyme, zu denen neben CaM auch je ein Häm-Ring, Flavinadenindinukleotid, Flavinadeninmononukleotid und Tetrahydrobiopterin (BH₄) je Monomer gehören.

Es finden sich eine C-terminal gelegene Reduktase-Domäne mit Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH sowie eine N-terminal gelegene Oxygenase-Domäne, welche die Bindungsstellen für Häm und BH₄ sowie das aktive Zentrum enthält.

Sowohl Häm, BH₄ als auch L-Arginin, also alle 3 Liganden der Oxygenase-Domäne fördern die Ausbildung der aktiven Dimer-Form, wobei insbesondere dem Porphyrinring eine entscheidende Rolle zukommt (Förstermann und Kleinert, 1995; Förstermann et al., 1998; Ricciardolo, 2003).

1.2.3. Reaktionsmechanismus

Bei der von den NOS katalysierten Reaktion werden L-Arginin, O₂ und NADPH als Substrate verbraucht und es entstehen L-Citrullin, NADP⁺+H⁺ und NO bzw.

ein Mix verschiedener Stickstoffverbindungen.

NADPH dient als $2e^-$ -Spender und es findet ein Elektronenfluss über FAD und FMN zum Häm statt, wobei die Flavine durch kovalente Elektronenbindung den Elektronenfluss von dem $2e^-$ -Donor NADPH zum $1e^-$ -Akzeptor Häm ermöglichen. Die Beobachtung, dass dieser e^- -Fluss in Abwesenheit des CaM verlangsamt ist, könnte die Regulierung der Ca-abhängigen NOS 1 und 3 erklären. Auch die alleinige Aktivität der Dimer-Form könnte ihre Erklärung in der Form des Elektronenflusses finden, da es scheint, dass FMN e^- nur auf das Häm der zum jeweils anderen Monomer gehörenden Oxydase-Domäne übertragen kann. L-Arginin wird in der Nähe der Hämgruppe gebunden, die maßgeblich daran beteiligt ist, in zwei Oxidationszyklen über die Zwischenstufe N-Hydroxy-Arginin (NHA) NO zu bilden. Dabei werden L-Arginin und O_2 verbraucht, neben NO entsteht auch L-Citrullin. Inwiefern tatsächlich direkt NO gebildet wird oder primär NO^- , bzw. ein Gemisch aus diesen oder weiteren reaktiven Stickstoffverbindungen wie Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist gegenwärtig noch Gegenstand der Forschung. Der Reaktionsmechanismus dieser vom Häm katalysierten e^- -Übertragung weist Ähnlichkeit mit denen in Häm-enthaltenden p450-Enzymen auf, welche in Kontrast dazu aber nur einen oxidativen Zyklus ausführen (Förstermann und Kleinert, 1995; Förstermann et al., 1998; Ricciardolo, 2003).

1.2.4. Regulation

In Anbetracht der vielfältigen Wirkungen von NO auf den Organismus wird klar, dass Ort und Zeitpunkt seiner Synthese stark reguliert sein müssen.

Alle Isozyme der NOS unterliegen einer, verschieden stark ausgeprägten, Kontrolle sowohl auf Transkriptions- als auch auf Aktivitätsebene. Während die erstgenannte Form jedoch eher typisch für iNOS ist, scheint bei NOS 1 und 3 eine Regulierung über das Aktivitätsniveau zu dominieren.

Von besonderem Interesse ist hier der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt. Die konstitutiven Enzyme NOS 1 und 3 binden das essentielle Ko-Enzym CaM nur in

Gegenwart erhöhter $[Ca^{2+}]$, während die Bindung von iNOS an CaM kaum vom intrazellulären Ca^{2+} beeinflusst wird (Stevens-Truss et al., 1995; Yuan et al., 1998; Korhonen et al., 2001).

Für die konstitutiven Formen NOS 1 und 3 wurden auch Phosphorylierungsstellen belegt, deren Phosphorylierung durch CaM-abhängige Kinasen bzw. Proteinkinase B ihre Aktivität modifiziert (Förstermann et al., 1998).

Für alle 3 Formen der NOS ist auch eine Modulation durch das Hitzeschockprotein Hsp 90 bekannt (Osawa et al., 2003).

Die Expressierung der iNOS wird vielfältig reguliert. So führen bakterielle Toxine wie LPS und proinflammatorische Zytokine der TH_1 -Immunantwort wie IL-1 β , TNF- α , IFN- γ zu erhöhter Expressierung, während TGF- β und Dexamethason sowie TH_2 -Zytokine wie IL-4, 10 und 13 diese abschwächen (Bogdan et al., 1994; Ruetten und Thiemermann, 1997; Munder et al., 1998; Dugas et al., 1998; Ameredes et al., 2001).

Eine weitere Modulation der iNOS-Expressierung findet über direkte Zell/Zell-Kontakte zwischen T_4^+ -Helferzellen und Makrophagen statt (Tao und Stout, 1993; Stout et al., 1996).

Die Induktion der iNOS-Transkription durch LPS benötigt dessen Bindung an ein Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) (Schumann et al., 1990). Der entstehende Komplex wird von einem GPI-Membran-verankerten bzw. löslichen CD-14 Ko-Rezeptor mit hoher Affinität erkannt (Wright et al., 1990; Lee et al., 1993). CD-14, welches keine Transmembrandomäne besitzt, interagiert nun mit dem Toll-like Rezeptor (TLR) 4 und dem akzessorischen Protein MD2 und führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999; Kawai et al., 2001).

Aktivierung einer I κ B-Kinase führt zu Phosphorylierung des I κ B- α -Komplexes, woraufhin der darin gebundene Transkriptionsfaktor NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern disloziert (Ozes et al., 1999; Tan et al., 2002; Hoshino et al., 1999; Heldwein et al., 2001). Verschiedene Arbeiten haben belegt, dass NF- κ B unter LPS Einfluss verstärkt an 2 im iNOS-Promoter vorhandene NF- κ B-Elemente bindet und das NF- κ B essentiell für LPS-induzierte iNOS-

Genexpression ist (Xie et al., 1994; Goldring et al., 1995; Lin und Lin, 1997; Hammermann et al., 2000; Tan et al., 2002).

Parallel dazu werden 3 Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase-Kaskaden aktiviert: Extrazellulär-signalregulierte Kinase (ERK), c-jun-N-terminale-Kinase (JNK) und p38 (Beck et al., 1999; Ropert et al., 2001; Guha und Mackmann, 2001; Baydoun et al., 1999).

In Folge dessen werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren, darunter wieder NF- κ B sowie AP-1, ein Heterodimer aus c-fos und c-jun, aktiviert. C-jun und c-fos werden durch sog. „immediate-early-genes“ kodiert, welche nach Zellstimulierung frühzeitig hochreguliert werden und die Expression induzierbarer Gene der Immunantwort steuern (Introna et al., 1986; Kaminska et al., 1992; Marks-Konczalik et al., 1998; Camhi et al., 1998; Tengku-Muhammad et al., 2000; Guha und Mackmann, 2001; Ye und Liu, 2001).

Sowohl der murine als auch der humane iNOS-Promotor enthalten NF- κ B und AP-1 Bindungsstellen (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1994; Kim et al., 1997; Pepperl et al., 2001).

Weiterhin wurde im Maus-iNOS-Promotor ein LRE_{AA}-genanntes LPS-responsives Element gefunden, welches essentiell für LPS-vermittelte iNOS-Induktion ist (Xie, 1997). Ein sehr ähnliches Element findet sich auch im iNOS-Promotor der Ratte (Beck und Sterzel, 1996).

Außerdem werden durch IFN- γ und auto-/parakrin durch LPS und NO stimuliertes IFN- β die Januskinasen JAK-1 und 2 aktiviert, welche den STAT1-Transkriptionsfaktor phosphorylieren. Dieser bildet daraufhin Homodimere, welche in den Kern dislozieren und dort an GAS (γ -activation sequence)-Bindungsstellen binden, wie sie auch im murinen iNOS-Promotor existieren (Xie et al., 1992; Gao et al., 1997; Liu et al., 1999; Jacobs und Ignarro, 2001, 2003).

In Folge kommt es direkt und über Interferon response factor (IRF)-1 zu vermehrter iNOS-Transkription (Goldring et al., 1996; Jacobs und Ignarro, 2001; Ables et al., 2001).

Weiterhin wird die iNOS-Transkription auch vermittelt P_{2Y} -Purinrezeptoren durch ADP und ATP beeinflusst. Diese führen über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} zu verstärkter Transkription der iNOS (Denlinger et al., 1996).

Die Menge des tatsächlich produzierten NOs wird weiterhin durch die Verfügbarkeit von extrazellulären L-Arginin sowie den Grad der intrazellulären Konkurrenz mit Arginasen um L-Arginin bestimmt (Hey et al., 1995, 1997; Hammermann et al., 1998; Morris et al., 1998; Chang et al., 1998). Auch eine Rückkopplungshemmung der iNOS-Aktivität durch NO wurde beschrieben (Griscavage et al., 1993).

1.3. Überblick L-Arginin

Da die proteinogene Aminosäure L-Arginin das einzige Substrat der NOS darstellt, kommt ihr eine besondere Bedeutung zu. Es handelt sich um eine semi-essentielle Aminosäure, die im gesunden Organismus in ausreichender Menge durch den Intermediärstoffwechsel bereitgestellt wird, aber in Phasen erhöhten Bedarfes wie Wachstum oder Krankheit essentiell werden kann.

Das Argininangebot speist sich aus der exogenen Aufnahme einerseits und dem durch Proteindegradation und de novo Synthese bereitgestelltem Arginin andererseits.

Eine zentrale Rolle bei der endogenen L-Arginin-Synthese aus L-Citrullin kommt der Niere zu.

L-Citrullin wird hierbei in der Niere von Zellen des proximalen Tubulus aufgenommen und durch die Aktivität von Argininosuccinatsynthase (ASS) und Argininosuccinatlase (ASL) zu L-Arginin umgewandelt. Ein Teil des in der Niere aufgenommenen L-Citrullins wird in den Epithelien des Gastrointestinaltraktes synthetisiert. Aus L-Glutamin oder L-Prolin wird hierbei L-Ornithin gebildet, welches durch die Enzyme Carbamoylphosphattransferase und Carbamoylphosphatsynthetase in L-Citrullin umgewandelt wird, das dann in den Blutkreislauf abgegeben wird (Wiesinger, 2001).

Das gebildete L-Arginin wird dann wieder in den Blutkreislauf abgegeben und steht somit anderen Geweben zur Verfügung.

Die Enzymausstattung um L-Arginin aus L-Citrullin zu synthetisieren, ist in verschiedenen Zellen in unterschiedlicher Ausprägung weitverbreitet. Zusätzlich wird ASS, welche den geschwindigkeitslimitierenden Schritt katalysiert, und teilweise auch ASL mit iNOS ko-induziert. Es ist daher vermutet worden, dass in NO produzierenden Zellen ein sogenannter Citrullin-NO-Zyklus abläuft, welcher bei der NO-Synthese verbrauchtes L-Arginin aus L-Citrullin regeneriert. Der quantitative Beitrag dieses Stoffwechselweges scheint gewebeabhängig zu sein und ist zur Zeit noch nicht abschließend geklärt (Wu und Brosnan, 1992; Baydoun et al., 1993; Wiesinger, 2001). Seine potentielle Bedeutung speist sich aus der Erkenntnis, dass das extrazelluläre L-Argininangebot produktionslimitierend für die iNOS sein kann, obwohl intrazellulär genügend Arginin vorhanden ist (Hammermann et al., 1998). Dieser als das Arginin-Paradox (Kurz und Harrison, 1997) bezeichnete Zustand wurde mit der Existenz zweier intrazellulärer L-Argininpools erklärt, auf deren einen die iNOS keinen Zugriff besitzt (Closs et al., 2000).

In den bei dieser Arbeit maßgeblichen RAM scheint der Citrullin-NO-Zyklus jedoch praktisch keine Bedeutung zu besitzen und der Transport von L-Arginin über die Zellmembran notwendig zu sein (Hammermann et al., 1998).

Neben der obengenannten Funktion spielt L-Arginin eine seit langem bekannte Rolle bei der Entgiftung des im Aminosäure-Intermediärstoffwechsel anfallenden Ammoniaks durch Arginase 1 im Krebs-Zyklus der Leber (Krebs und Henseleit, 1932).

Arginase 1 ist Vertreter einer weitverbreiteten Enzymfamilie, von der im Mensch und in der Ratte 2 Isoformen mit ausgeprägter Konservierung existieren, die cytosolische, lebertypische Arginase 1 sowie die mitochondriale Arginase 2.

Durch Arginase 1 und 2 sowie Arginin-Decarboxylase wird L-Arginin in weiteren Stoffwechselwegen zu einem wichtigen Vorläufer für unter anderem Polyamine, L-Prolin, L-Glutamin und Agmatin.

Die Rolle von L-Arginin als Prekursor so verschiedener Signalmoleküle wie NO, Agmatin, L-Glutamat und der sich daraus ableitenden GABA unterstreicht erneut seine Stoffwechselbedeutung (Wiesinger, 2001).

1.4.1. Überblick Transportmechanismen für kationische Aminosäuren

Kinetische Studien führten zu der Erkenntnis, dass 4 verschiedene Systeme zum Transport kationischer Aminosäuren (AS) wie Arginin, Lysin und Ornithin über die Zellmembran von Säugetieren existieren.

Es handelt sich hierbei um die Systeme y^+ , y^+L , $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$, wobei y^+ die größte Bedeutung innezuhaben scheint.

Nur System y^+ ist weitgehend selektiv für kationische AS, während die anderen auch neutrale AS transportieren. Weitere y^+ -Eigenschaften sind Na^+ -Unabhängigkeit, Transstimulierbarkeit und Sättigbarkeit des Transports.

Durch das y^+ -like system (y^+L) werden kationische AS bei niedrigerer Affinität und hoher Kapazität Na^+ -unabhängig transportiert. Weiterhin findet jedoch auch ein Transport neutraler AS mit hoher Affinität und niedriger Kapazität statt.

Sowohl $b^{0,+}$ als auch $B^{0,+}$ sind durch den Transport kationischer AS mit hoher Affinität gekennzeichnet, jedoch ist $B^{0,+}$ im Gegensatz zu $b^{0,+}$ Na^+ -abhängig.

Diesen Systemen ließen sich bisher 2 Familien von Transportproteinen zuordnen:

Die Kationischen Aminosäure-Transporter (CAT) mit ausschließlich y^+ -Transporteigenschaften und die Broad Scope Amino Acid Transport Proteins (BAT). Der BAT-Familie werden verschiedene heteromere Transportproteine zugeordnet. So rechnet man rBAT/D2 und $b^{0,+}AT$ dem $b^{0,+}$ -System zu, während für das $y^{0,+}$ -System 4F2hc und y^+LAT1 bzw. y^+LAT2 bekannt sind. Weiterhin konnte eine $ATB^{0,+}$ genannte cDNA für das System $B^{0,+}$ isoliert werden.

Es ist dabei noch nicht abschließend geklärt, inwiefern die Proteine der BAT-Familie Transporter oder nur am Transport beteiligte Proteine darstellen (Bertran et al., 1992; Closs 1996, 2002; Devès und Boyd, 1998).

1.4.2. Kationische Aminosäuretransporter (CATs)

Den Kationischen Aminosäuretransportern (CAT) werden derzeit die Transportproteine CAT-1, 2A, 2B, 3 und 4 zugerechnet. Genanalysen zeigten einen hohen Grad der Konservierung zwischen den CATs verschiedener Species und Hydrophobizitätsanalysen führten zu der Annahme, dass sie in vivo 12 bzw. 14 Transmembrandomänen ausbilden (Closs, 1996; Closs et al., 1997).

Als erster Vertreter wurde CAT-1 in dem ecotrophischem murinen Leukämie Virus-Rezeptor 1 erkannt (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991). Er ist ubiquitär verbreitet mit Ausnahme der Leber und wird als der Haupttransporter für kationische AS angesehen. Seine Exprimierung ist konstitutiv, kann aber gewebeabhängig auch induziert werden. Er ist der Prototyp eines y^+ -Transporters und ist ebenso wie CAT-2A und CAT-2B spannungsabhängig (Kavanaugh, 1993; MacLeod und Kakuda, 1996; Closs et al., 1997; Nawrath et al., 2000).

CAT-1 soll zudem gemeinsam mit eNOS in sogenannten caveolären Komplexen vorkommen (MacDonald et al., 1997, Förstermann et al., 1998).

Das CAT-2 Gen besteht aus 12 Exons und mehreren Promotoren, durch alternatives Splicen entsteht unter Verwendung von Exon 7 CAT-2A oder CAT-2B unter Verwendung von Exon 6 (Finley et al., 1995; Closs, 1996; MacLeod und Kakuda, 1996).

Die cDNAs dieser 2 Transporter unterscheiden sich daher lediglich in 20 bp auf einer Länge von 42 bp. Trotz dieser geringen Unterschiede präsentieren die resultierenden Transporter deutlich differente Transportcharakteristiken.

CAT-2A transportiert kationische AS mit vergleichsweise niedriger Affinität und hoher Kapazität und ist nur gering transstimulierbar. Er wird hauptsächlich in der Leber exprimiert. CAT-2B besitzt ein eher CAT-1 vergleichbares Transportverhalten und ist typisch für aktivierte Makrophagen (Closs et al., 1993 a + b, 1997; Nawrath et al., 2000; Habermeier et al., 2003). CAT-2B ist

entscheidend für die Substratzufuhr für iNOS in Makrophagen, welche nicht auf den gesamten intrazellulären Argininpool zugreifen kann und damit von extrazellulärem Arginin abhängig ist (Stevens et al., 1996; Hammermann et al., 1998; Closs et al., 2000; Nicholson et al., 2001). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass die Expression von CAT-2B parallel zu der der iNOS durch LPS gesteigert wird (Closs et al., 2000; Messeri Dreissig et al., 2000; Kakuda et al., 1999), es gibt hierbei jedoch Hinweise auf unterschiedliche Signaltransduktionswege (Baydoun et al., 1993; Caivano, 1998). Die CAT-2B-Expression ist abhängig von NF- κ B und p38MAP-Kinase und wird durch Dexamethason und Spermin inhibiert (Caivano, 1998; Hammermann et al., 2000; Mössner et al., 2001; Closs, 2002). Auch eine Steigerung der CAT-2-B-Expression durch Hypoxie wurde beschrieben (Louis et al., 1998). Nach einer neueren Klassifikation werden die CAT-2 Transporter auch als Slc7a2 (soluble carrier family 7, member 2) bezeichnet.

Weitere Vertreter der CAT-Familie sind der für Neuronen typische CAT-3 (Hosokawa et al., 1997) sowie CAT-4 (Sperandeo et al., 1998).

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der zellulären Signaltransduktion in RAM bei der parallelen Induktion von iNOS und CAT-2B durch LPS.

1997 publizierte Xie ein neues LPS responsives Element (LRE_{AA}) im murinen iNOS-Promotor, das für die iNOS-Stimulation durch LPS notwendig ist. Eine sehr ähnliche Sequenz findet sich auch im iNOS-Promotor der Ratte.

Es stellte sich nun die Frage, ob diese Sequenz bei der Ratte eine gleichartige Bedeutung besitzt und ob der durch LPS parallel zur iNOS induzierte CAT-2B auch durch ein solches Element kontrolliert wird. Weiterhin sollte die Beteiligung von AP-1 im Rahmen der LPS-vermittelten Induktion von iNOS und CAT-2B untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Gewinnung und Kultur von Rattenalveolarmakrophagen

Die Untersuchung fand an Rattenalveolarmakrophagen (RAM) von Sprague Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts statt. Als Zellen des Immunsystems ist bei ihnen die Induktion von iNOS und CAT-2B sehr deutlich ausgeprägt. Die Tiere wurden durch Schlag mit einer Metallstange betäubt, danach wurden das Rückenmark unterhalb des Foramen Magnum durchtrennt und die Karotiden eröffnet. Nach Eintritt des Todes durch Exsanguination wurden Lunge und Trachea en bloc exzidiert und die RAM mit PBS-Lösung (siehe 2.6.) ausgespült. Die Lavageflüssigkeit wurde anschließend zentrifugiert, das Zellsediment mit PBS gewaschen und die gewonnenen Zellen anschließend in DMEM-Medium aufgenommen.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung der Trypanblau-Färbung zur Vitalitätsbestimmung.

Anschließend wurden pro Kulturschale 5 Mio Zellen je nach Protokoll in 1 ml bzw. 2 ml Medium ausgebracht.

Jetzt wurden die Kulturschalen für 2 h bei 37° C und 5 % CO₂ zur Adhärenz in den Inkubator überführt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel (je nach Protokoll 500 µl bzw. 2 ml) zur Entfernung noch vorhandener Erythrozyten und anschließend die Inkubation mit und ohne LPS und in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Desoxyoligonukleotiden (ODN). Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme des Mediums und die Lyse der Zellen. Weitere Präparation siehe unter 2.4. RNA-Präparation mit RNA-Präp Kit von Sigma bzw. Eppendorf.

2.2. Protokoll für die Untersuchung von rc-jun und rc-fos

Jeweils ein Ansatz mit und ohne LPS-Zusatz (1 µg/ml) wurde für 30 min, 60 min und 5 h inkubiert und anschließend Veränderungen der Expression von c-jun, c-fos und iNOS auf mRNA-Ebene untersucht.

2.3. Protokoll für die Versuche mit Decoy-Desoxyoligonukleotiden

- Vorbereitung der ODN: je 150 µl AP-1 (100 µM) s und as,
bzw. je 150 µl LRE_{AA} (100 µM) s und as,

in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen.

Dann für 5 min bei 95° C erhitzen um die Stränge zu denaturieren und anschließend 3 h bei Raumtemperatur abkühlen lassen.

- ODN-Ansatz:

In verschiedenen Experimenten wurden die Zellen für 4 h bzw. 20 h mit verschiedenen Konzentrationen von ODN (LRE_{AA}, AP-1) inkubiert und anschließend nach Zugabe von LPS (1 µM) weitere 5 h inkubiert. Im Anschluss wurden Veränderungen der Expression von mRNA für iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 im Vergleich zu einer Kontrolle ohne ODN und einer Kontrolle ohne ODN und ohne LPS untersucht.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. RNA-Präparation

Alle Zentrifugationsschritte bei der Präparation fanden in einer auf 4° C vorgekühlten Kühlzentrifuge mit 14.000 g statt. Beim Pipettieren fanden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen Verwendung.

2.4.1.1. RNA-Präparation mit dem Pröp.-Kit 70 von Sigma

Protokoll laut Hersteller

Nach Ablauf des Zellkulturprotokolles wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 250 µl Lysepuffer lysiert. Das Zelllysat wurde mehrfach auf- und abpipettiert um die DNS zu scheren und anschließend in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Es bestand die Möglichkeit das Lysat bei -80°C einzufrieren oder sofort mit der RNA-Präparation fortzufahren.

Hierzu wurden die lysierten Zellen in die blaue Filtersäule pipettiert und anschließend für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt führte zur Entfernung von Zelltrümmern und zur Scherung der DNS.

Die Filtersäule wurde anschließend ohne das Sammelröhrchen verworfen und zu dem darin enthaltenen Zellfiltrat 250 µl 70% EtOH hinzugefügt.

Die erhaltene Lösung wurde durch Pipettieren vermischt und in eine Bindungssäule eingebracht. Danach erfolgte für 15 s eine erneute Zentrifugation. Das Filtrat wurde verworfen, die Bindungssäule aber erneut in das Sammelröhrchen eingesetzt und 500 µl Waschlösung 1 in die Säule pipettiert.

Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 s.

Jetzt wurde das alte Sammelröhrchen verworfen und die Bindungssäule in ein neues Sammelröhrchen überführt. Im Anschluß wurden 500 µl Waschlösung 2 in die Säule pipettiert und 15 s zentrifugiert.

Das Filtrat wurde ohne Sammelröhrchen verworfen und die Säule erneut mit 500 µl Waschlösung 2 befüllt. Zum Trocknen der Säule folgten wieder 2 min Zentrifugation.

Die Bindungssäule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß übernommen und zur Auswaschung der RNA 50 µl der Elutionslösung auf die Säulenmembran pipettiert. Anschließend Zentrifugation für 1 min.

Alternativ konnte die RNA bei -80° C eingefroren oder während der anschließenden Konzentrationsbestimmung auf Eis zwischengelagert werden.

Alle Pipettierschritte mit der gereinigten RNA-Probe erforderten die Verwendung gestopfter Pipettenspitzen und fanden unter einem Abzug statt, um der Gefahr eines Abbaus der RNA durch Verunreinigung mit ubiquitär vorkommenden RNAsen vorzubeugen.

2.4.1.2. RNA-Präparation mit dem Perfect RNA[®]-Kit von Eppendorf[®]

Protokoll laut Hersteller

Nach Ablauf des Zellkulturprotokolles wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 300 µl Lysepuffer lysiert. Das Zelllysate wurde mehrfach auf- und abpipettiert um die DNS zu scheren und anschließend in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Es bestand die Möglichkeit das Lysat bei -80° C einzufrieren oder sofort mit der RNA-Präparation fortzufahren.

In einem ersten Schritt wurden die Proben 5 min zentrifugiert. Anschließend überführte man den Überstand ohne feste Bestandteile in je ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß. Zu diesen fügte man jeweils 300 µl EtOH (70%) hinzu und mischte durch vorsichtiges Kippen der Röhren. In gleicher Weise wurden je 200 µl aufgeschüttelter Perfect RNA[®] Binding Matrix Solution hinzugegeben und durchmischt.

Jetzt wurde die Lysat/EtOH/Binding Matrix-Solution in jeweils ein Spin column pipettiert und diese anschließend 60 s zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule wieder im gleichen Eppendorf-Gefäß platziert.

Zu jeder Probe wurden jetzt 700 µl Waschlösung 1 hinzugefügt und daraufhin 30 s zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen und das Eppendorf-Gefäß samt Säule 30 s zentrifugiert, um alle Reste der Waschlösung zu entfernen.

Im nächsten Schritt überführte man die Säule in ein Sammelröhrchen und pipettierte 500 µl Waschlösung 2 hinzu. Nach erneuten 15 s Zentrifugation wurde das Filtrat verworfen und die wieder in das Gefäß platzierte Säule mit weiteren 500 µl Waschlösung befüllt. Wieder wurde 15 s zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule in das Röhrchen zurückgetan.

Jetzt wurde zum Entfernen der Waschlösung 2 für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde jetzt in ein neues Sammelröhrchen überführt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser befüllt. Um eine vollständige Benetzung der Membran zu erreichen, musste das Röhrchen mit der Säule jetzt 1 s auf dem Vortex-Gerät gerüttelt werden und kam anschließend für 5 min in ein 50° C Wasserbad.

Anschließend wurden die Proben noch einmal 5 min durchmischt und dann durch 2 min zentrifugieren die RNA eluiert.

Die gereinigte RNA wurde sofort auf Eis gestellt und entweder bei -80° C tiefgefroren oder gleich einer photometrischen RNA-Messung wie unter 2.4.2. beschrieben zugeführt.

2.4.2. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl der gereinigten RNA-Proben in 78 µl Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser aufgenommen (Verdünnung 1:40). Es fand das Photometer Gene Quant II der Firma Pharmacia Biotech Verwendung.

Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm in einer Quatzküvette, gleichzeitig Kontrolle durch OD-Messung bei 320 nm zur Erfassung von Proteinverunreinigungen.

2.4.3. Omniscript RT-Reaktion

Protokoll nach Anweisungen des Herstellers (Omniscript)

Gegebenenfalls wird zuerst die bei -80°C eingefrorene RNA-Probe auf Eis aufgetaut. Auch die weiteren Reagenzien (Primer, 10 x RT-Puffer, dNTP-Mix und RNase-freies Wasser müssen auf Eis gestellt werden). Es wurden gestopfte Pipettenspitzen verwendet und alle Pipettierschritte fanden unter einem Abzug statt um RNA-Abbau durch ubiquitäre RNAsen vorzubeugen.

Alle Lösungen wurden vor der Benutzung per Vortex durchmischt.

Die pro RT-Reaktion eingesetzte RNA-Menge betrug $1\ \mu\text{g}$. Das ausgerechnete Volumen der DNS-Probe wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von $12\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Inklusive von je $8\ \mu\text{l}$ Mastermix (laut Herstellerprotokoll) betrug das Endvolumen $20\ \mu\text{l}$.

Anschließend fanden $60\ \text{min}$ Inkubation bei 37°C zur reversen Transkription statt, an welche sich $5\ \text{min}$ bei 93°C zur Inaktivierung des Enzyms anschlossen. Zuletzt wurde die erhaltene cDNA herabzentrifugiert, mit $80\ \mu\text{l}$ sterilem H_2O aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

2.4.4. PCR

Es wurde mit 2 verschiedenen Kits gearbeitet. Die Untersuchungen zu c-jun und c-fos fanden mit Sigma Red-Taq[®] Polymerase in einem Stratagene Robocycler statt.

Für die ODN-Untersuchungen wurde Invitrogen[®]Taq-Polymerase in einem MWG[®] Hybaid Thermo-Cycler benutzt.

Es fanden folgende PCR-Programme Verwendung:

<u>1.</u>	<u>Denaturierung</u>	<u>94°C</u>	<u>3 min, einmalig</u>	
2.1.	Denaturierung	94°C	45 s	
2.2.	Annealing	54°C	30 s	23-30 Zyklen
<u>2.3.</u>	<u>Polymerisation</u>	<u>72°C</u>	<u>1 min</u>	
3.	Polymerisation	72°C	10 min, einmalig	

Primer	rc-fos	rc-jun	r β -Aktin	ri-NOS	rCAT-2B	rARG 1	rARG 2
Zyklenzahl	35	35	23-25	23-25	25	25	30

Mit der Intention des Ermöglichens gleichmäßigerer Volumeneinstellung wurden autoklavierte anstelle von gestopften Pipettenspitzen verwendet.

Alle Reagenzien wurden erst unmittelbar vor der PCR aufgetaut, die Taq-Polymerase nur auf 4° C um Aktivitätsverluste zu vermeiden.

2.4.4.1. PCR mit Red Taq[®]-Polymerase

PCR-Protokoll laut Hersteller (Sigma[®])

Die PCR-Reaktionen werden in einem 0,2 ml Eppendorf-Gefäß mit einem Endvolumen von 40 μ l durchgeführt.

Zu Beginn werden 25,5 μ l steriles H₂O in jedes Gefäß pipettiert. Anschließend werden je 2 μ l des zu untersuchenden Primerpaares (100 μ M, s und as), 4 μ l cDNA-Pool sowie 6,5 μ l frisch angesetzter PCR-MasterMix dazugegeben und beim Pipettieren durchmischt.

Das weitere Procedere erfolgt im Stratagene[®] Robocycler.

2.4.4.2. PCR mit Invitrogene[®]Taq-Polymerase

PCR-Protokoll laut Hersteller (Invitrogene[®])

Die PCR-Reaktionen werden in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß mit einem Endvolumen von 50 μ l durchgeführt. Zu Beginn werden 32 μ l steriles H₂O in jedes Gefäß pipettiert. Anschließend werden je 2,5 μ l des zu untersuchenden Primerpaares (100 μ M, s und as), 5 μ l cDNA-Pool sowie 8 μ l frisch angesetzter PCR-MasterMix dazugegeben und beim Pipettieren durchmischt. Anschließend wird mit 60 μ l Mineralöl überschichtet. Das weitere Procedere erfolgt im MWG[®] Hybaid Thermocycler .

2.4.5. Elektrophorese im Agarosegel

Während des PCR-Laufes wurde ein 1,2 % Agarosegel (150 ml 0,5 % TBE-Puffer mit 1,8 g Agarose) mit Ethidiumbromid (5 μ l, 0,1%) gegossen. Dieses wurde mit dem entsprechenden Kamm für ungefähr 1,5 Stunden zum Auspolymerisieren stehengelassen. Anschließend wurde der Kamm gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Je Geltasche wurde 38 μ l (Sigma Red-Taq[®]) bzw. 43 μ l (Invitrogene[®]Taq-Polymerase, PCR-Probe hier vor dem Auftragen mit 5 μ l Trypanblau markiert) der Probe pipettiert, eine weitere Geltasche wurde mit 5 μ l Marker (Eurogentec Smartladder[®], 200 bp) befüllt.

Die angelegte Stromstärke wurde je nach gewünschter Laufzeit variiert, betrug jedoch maximal 73 mA.

Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels einer Videokamera unter UV-Fluoreszenz. Die Screenshots wurden auf Thermopapier ausgedruckt und auf Diskette gespeichert.

2.5. Verwendete Software, Statistische Auswertung

Microsoft[®] Word X für Mac[®]:

Alle Texte wurden mit diesem Programm erstellt.

Microsoft[®] Excel[®] X für Mac[®]:

Dieses Programm wurde zur mathematischen Kalkulation der Versuchsergebnisse eingesetzt. Die ermittelten Daten der Versuche wurden in Datenblätter eingetragen. Im nächsten Schritt wurden Quotienten der Werte der Probenbanden mit denen der r β -Aktin Kontrollbanden gebildet. Diese wurden sodann in Prozent der als Referenz definierten Bande (Kontrolle + LPS) ausgedrückt und aus diesen Prozentwerten Mittelwerttabellen errechnet.

GraphPad InStat[®]

Weiterhin diente GraphPad InStat[®] zur Erstellung aller in dieser Arbeit publizierten Diagramme sowie als Statistiktest zur Berechnung des Standardfehlers der Mittelwerte (gepaarter t-Test).

MWG Biotech[®] RFLP-Scan 2.01

Der Einsatz des Computerprogrammes RFLP-Scan erfolgte zur semiquantitativen Ausmessung der PCR-Ergebnisse. Die auf Diskette gespeicherten Bilder der Geldokumentation dienten als Datengrundlage. Die errechneten Werte für die optischen Dichten bildeten die Grundlage der in Excel[®] erstellten Datenblätter.

Genomatix MatInspector (Version 7.2.2.)

Mithilfe dieses Programmes wurden Genomsequenzen auf mögliche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren hin analysiert.

2.6. Ansatz der verwendeten Medien und Lösungen

PBS Puffer (10 x)

KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	11,5 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Mischen. Autoklavieren. Zur Benutzung mit Aqua bidest. auf 1 x PBS Puffer herabverdünnen.

TBE-Puffer (5 x)

-Tris	54,90 g
-------	---------

-Borsäure	27,50 g
-EDTA	4,65 g
-Aqua bidest.	ad 1000 ml

für das Gießen eines Agarosegels mit Aqua bidest. auf 0,5 % TBE verdünnt

Basisnährmedium

DMEM/F12 HAM	1 Portion
Steriles Wasser	1000 ml
NaHCO ₃	2,4 g

DMEM/F12 HAM in sterilem Wasser lösen, Natriumbicarbonat beifügen und den pH-Wert der Lösung mittels 1 M NaOH auf 7,2 einstellen. Sterilfiltration.

Medium für Primärzellen (RAM)

Basismedium (s.o.)	187,8 ml
FKS	10,0 ml
Penicillin/Streptomycin Lsg.	2,0 ml
Amphotericin B-Lösung	400,0 µl

DEPC-Wasser

DEPC	200 µl
Steriles Wasser	ad 100 ml

Gut durchmischen und anschließend autoklavieren.

2.7. Liste der verwendeten Substanzen und Chemikalien

	<u>Hersteller</u>
Agarose	Carl Roth GmbH
Amphotericin B	Sigma
β-Mercaptoethanol (98+ %) for molecular biology	Sigma
Borsäure (%)	Merck KGaA
DEPC	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)	Merck KGaA

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium(DMEM/F12 HAM)	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol (absolut)	Merck KGaA
Ethidiumbromid (0,1 %)	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco
Gen Elute Mammalian Total RNA-Kit	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Mineralöl (light mineral oil)	ICN Biomedicals Inc.
N-(1-Naphtyl)-ethylendiaminhydrochlorid	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA
Oligo(dt) ₁₈ -Primer (10 µM)	MWG Biotech
Omniscript RT-Kit	Quiagen
-Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/µl)	
-Puffer RT (10 x)	
-dNTP-MIX (dATP,dCTP,dGTP,dTTP, 5 mM je)	
PCR dNTP-MIX (dATP,dCTP,dGTP,dTTP 10 mM je)	Sigma
PCR Kit	Invitrogene
-MgCl ₂ (50 mM)	
-PCR-Puffer (-MgCl ₂ , 10 x)	
-Taq DNS-Polymerase (5 U/µl)	
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma
Perfect RNA, Eucaryotic, Mini RNA-Präp-Kit	Eppendorf
Phosphorsäure (2,5 %)	Merck KGaA
RedTaq DNS-Polymerase (1 U/µl)	Sigma
+ 10 x RedTaq PCR-Puffer (incl.MgCl ₂)	
RNA Präp-Kit 70	Sigma
RNAsin (40 U/min)	Promega
SmartLadder (DNS-Leiter, 200 Sprossen)	Eurogentec
Sulfanilamid	Merck KGaA
Tris	Carl Roth GmbH
Trypanblau (0,4 %)	Sigma

Primerpaare für PCR

	<u>Basensequenz</u>	<u>Hersteller</u>
<u>β-Aktin</u>		
rAktin-s	5`-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GC-3`	MWG-Biotech
rAktin-as	5`-AGA GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3`	MWG-Biotech
<u>iNOS</u>		
riNOS-s	5`-GCC CAG GTC GAT GCA CAA CTG G-3`	MWG-Biotech
riNOS-as	5`-CAT GAA CTC CAA GAG TTT GAC CAG-3`	MWG-Biotech
<u>CAT2B</u>		
mCAT2A-s	5`-GAA GAT TCC AAA CTC TGC CGC-3`	MWG-Biotech
rCAT2B-as	5`-CAA CCC ATC CTC CGC CAT AGC-3`	MWG-Biotech
<u>ARG1</u>		
rARG1-s	5`-AAA GCC CAT AGA GAT TAT CGG AGC G-3`	MWG-Biotech
rARG1-as	5`-AGA CAA GGT CAA CGG CAC TGC C-3`	MWG-Biotech
<u>ARG2</u>		
rARG2-s	5`-TTA GTA GAG CTG TGT CAG GTG GC-3`	MWG-Biotech
rARG2-as	5`-ACT TGA AGC AAT CAC ATC CAC TGC-3`	MWG-Biotech
<u>c-jun</u>		
rcjun-s	5`-AGC AGA GCA TGA CCT TGA AC-3`	MWG-Biotech
rcjun-as	5`-GTT GAA GTT GCT GAG GTT GG-3`	MWG-Biotech
<u>c-fos</u>		
rcfos-s	5`-CTG TCC GTC TCT AGT GCC AA-3`	MWG-Biotech
rcfos-as	5`-GCT CAG GGT CAT TGA GAA GA-3`	MWG-Biotech

ODN (PTO 3` und 5`)AP-1

AP-1-s	5`-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3`	MWG-Biotech
AP-1-as	5`-TTC CGG CTG AGT CAT CAA GCG-3`	MWG-Biotech

LRE_{AA}

LRE _{AA} -s	5`-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3`	MWG-Biotech
LRE _{AA} -as	5`-CAG AGC TGT TTT GCA TAA AG-3`	MWG-Biotech

mLRE_{AA}

mLRE _{AA} -s	5`-CTT TAT GCA CCA CAG CTC TG-3`	MWG-Biotech
mLRE _{AA} -as	5`-CAG AGC TGT GGT GCA TAA AG-3`	MWG-Biotech

3.0. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Expression von mRNA für c-fos und c-jun in LPS-aktivierten RAM in Abhängigkeit von der Zeit

Untersucht wurden die Auswirkungen einer Stimulation von RAM mit LPS (1 µg/ml) auf die Expression von mRNA für rc-fos und rc-jun nach 30 min, 60 min und 5 h. Zur Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt auch ein Ansatz ohne LPS mitgeführt. Weiterhin wurde auch die mRNA für iNOS bestimmt, deren zeitabhängiger Anstieg nach LPS-Stimulation aus früheren Arbeiten bekannt war.

3.1.1. Anstieg der mRNA-Expression für rc-jun und rc-fos nach LPS-Stimulation

Adhärierte RAM wurden in An- bzw. Abwesenheit von LPS inkubiert und nach 0 min, 30 min, 60 min oder 5 h lysiert, um eine Aussage über den Zeitverlauf etwaiger Veränderungen treffen zu können. Die Zelllysate wurden nach RNA-Präparation durch RT-PCR und Gelelektrophorese auf die Expression von mRNA für rc-fos, rc-jun und iNOS untersucht. Die Anzahl der Versuche betrug n=4 (Abb. 1A, 1B und 2).

Betreff der iNOS zeigte sich ein rascher Anstieg der mRNA-Expression mit LPS. Die optische Dichte der entsprechenden PCR-Bande stieg auf 380 % im Vergleich zur Kontrolle nach 60 min an sowie erwartungsgemäß noch deutlicher auf 3700 % nach 5 h an (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Auswertung von rc-fos und rc-jun zeigte teilweise deutliche Anstiege der Expression der zugehörigen mRNA, deren Maxima nach 0,5 beziehungsweise 1 h auftraten. Nach 5 h Inkubation mit LPS unterschied sich die Expression von rc-fos und rc-jun nur unwesentlich von der der LPS-freien Kontrollen. In jedem Experiment kam es zu einem Anstieg der mRNA für rc-jun und rc-fos. Allerdings war der maximale Anstieg entweder bei 0,5 h oder bei 1 h zu beobachten, wodurch für den jeweiligen Zeitpunkt kein klar signifikanter Anstieg zu beobachten war (Abb. 1A).

Wurden allerdings die Maximalwerte in jedem experimentellen Ansatz zusammen ausgewertet, ergab sich ein klares Bild, das einen signifikanten Anstieg beider mRNA aufzeigte (Abb. 1B).

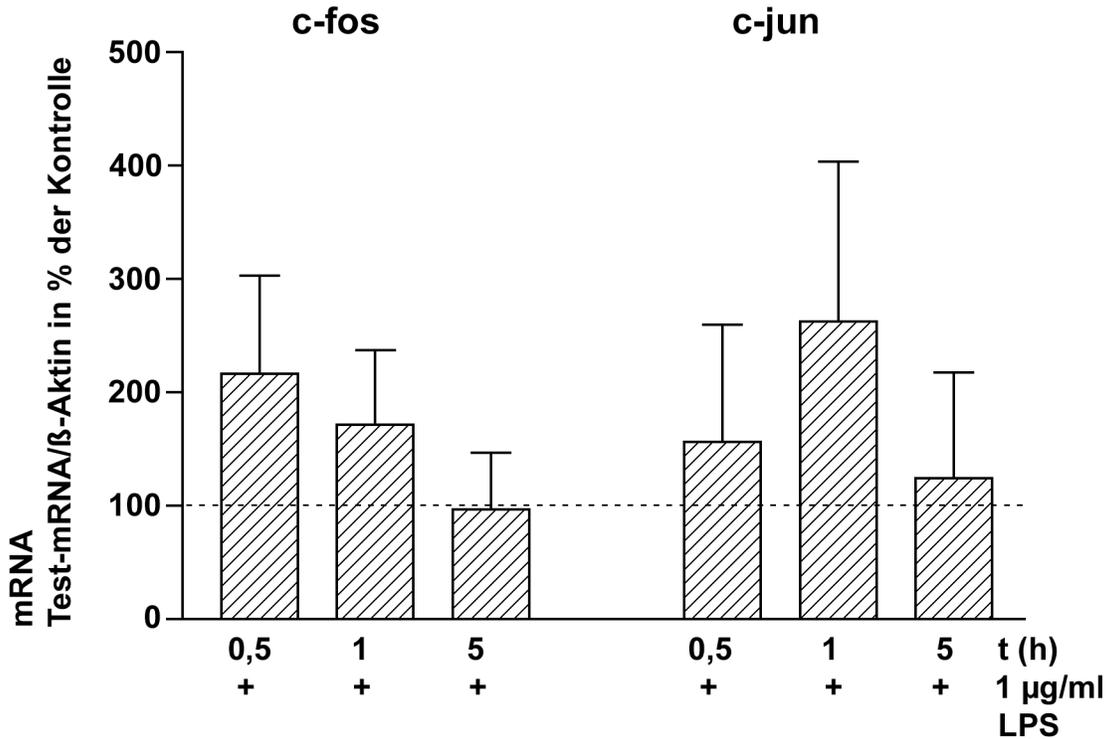


Abb. 1 A: Effekt von LPS auf die Expression von c-fos und c-jun in RAM. Die Zellen wurden 0,5, 1 oder 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, eine RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt und die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt. Dann wurde die optische Dichte der Banden ausgemessen. Die Ergebnisse wurden durch den zugehörigen Wert für β -Aktin geteilt und in % der jeweils zeitkorrigierten Kontrollen ohne LPS ausgedrückt. Das Niveau dieser Kontrollen wurde durch die gestrichelte Linie zusätzlich hervorgehoben. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar.

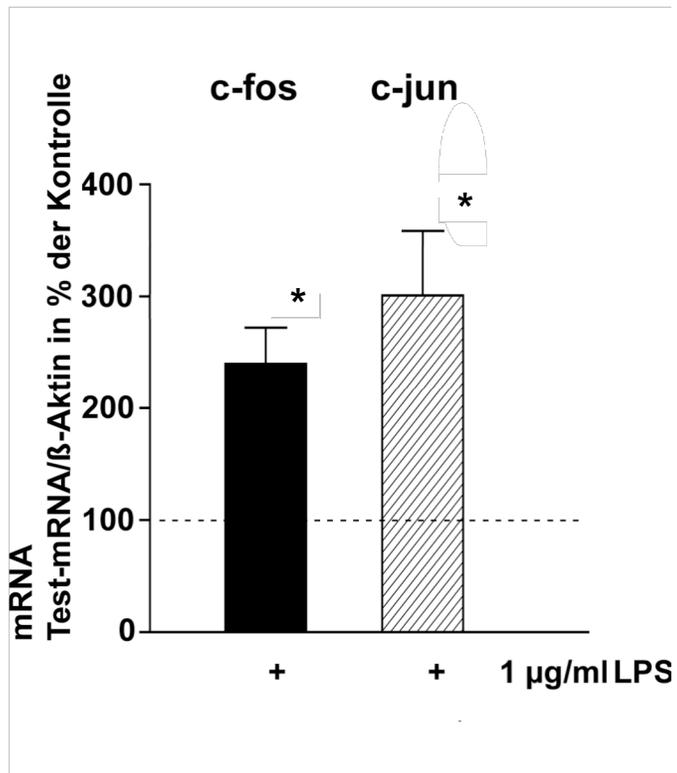


Abb. 1 B: Effekt von LPS auf die Expression von c-fos und c-jun in RAM. Im Unterschied zur Darstellung in Abb. 1 A wurden hierbei die jeweiligen Maxima der Expression von c-fos und c-jun nach 0,5 oder 1 h Inkubation mit LPS herangezogen. Das Niveau der Kontrollen wurde durch die gestrichelte Linie zusätzlich hervorgehoben. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * p<0,05 Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, ermittelt mit gepaartem t-Test.

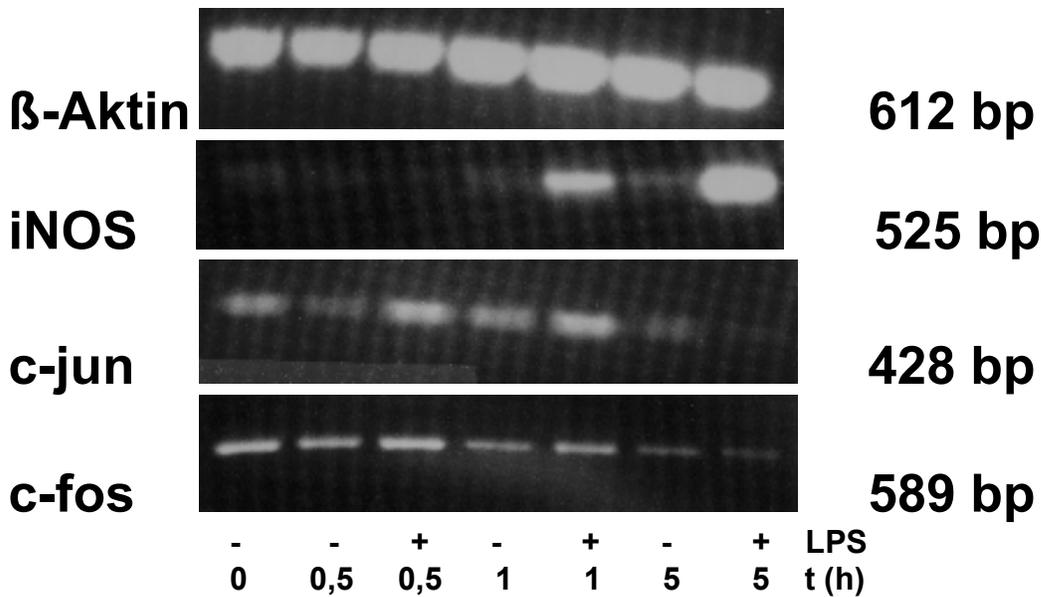


Abb.2: Effekt von LPS auf die mRNA-Expression von iNOS, c-fos und c-jun in RAM. Die Zellen wurden mit oder ohne LPS inkubiert (30 min, 1 h, 5 h) und anschließend lysiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, eine RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die abgebildeten Banden stellen repräsentative Originale derselben Serie von Experimenten wie in Abb. 1 A und 1 B dar, die daher nicht in jedem Punkt zu den Mittelwerten kongruent sind.

3.2. Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Expression von iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in LPS-stimulierten RAM durch Decoy-Desoxyoligonukleotide.

Untersucht wurde die Beeinflussung der mRNA-Expression für iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in für 5 h LPS (1 µg/ml)-stimulierten RAM durch vorhergehende Inkubation mit ODN für AP-1 und LRE_{AA}. Als Kontrollen wurden ein Ansatz ohne LPS und ohne ODN sowie ein Ansatz mit LPS und ohne ODN mitgeführt. Adhärierte RAM wurden für 4 h bzw. 20 h mit 3 µM bzw. 10 µM ODN für LRE_{AA} oder AP-1 inkubiert. Anschließend wurde LPS (1 µg/ml) zugefügt und weitere 5 h inkubiert. Die Zelllysate wurden nach RNA-Präparation durch RT-PCR und Gelelektrophorese auf Expression von mRNA für iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 untersucht. Da sich in früheren Untersuchungen gezeigt hatte, dass das Ausgangsniveau der Expression der iNOS teilweise deutlich variiert, unter Stimulation mit LPS (1 µg/ml) nach 5 h jedoch ein maximales Niveau

erreicht wird, entschieden wir uns, alle Werte in % dieser LPS-Kontrollen anzugeben.

3.2.1. Einfluss von AP-1 Decoy-Desoxyoligonukleotiden

3.2.1.1. 4 h Inkubation mit AP-1-Decoy-Desoxyoligonukleotiden

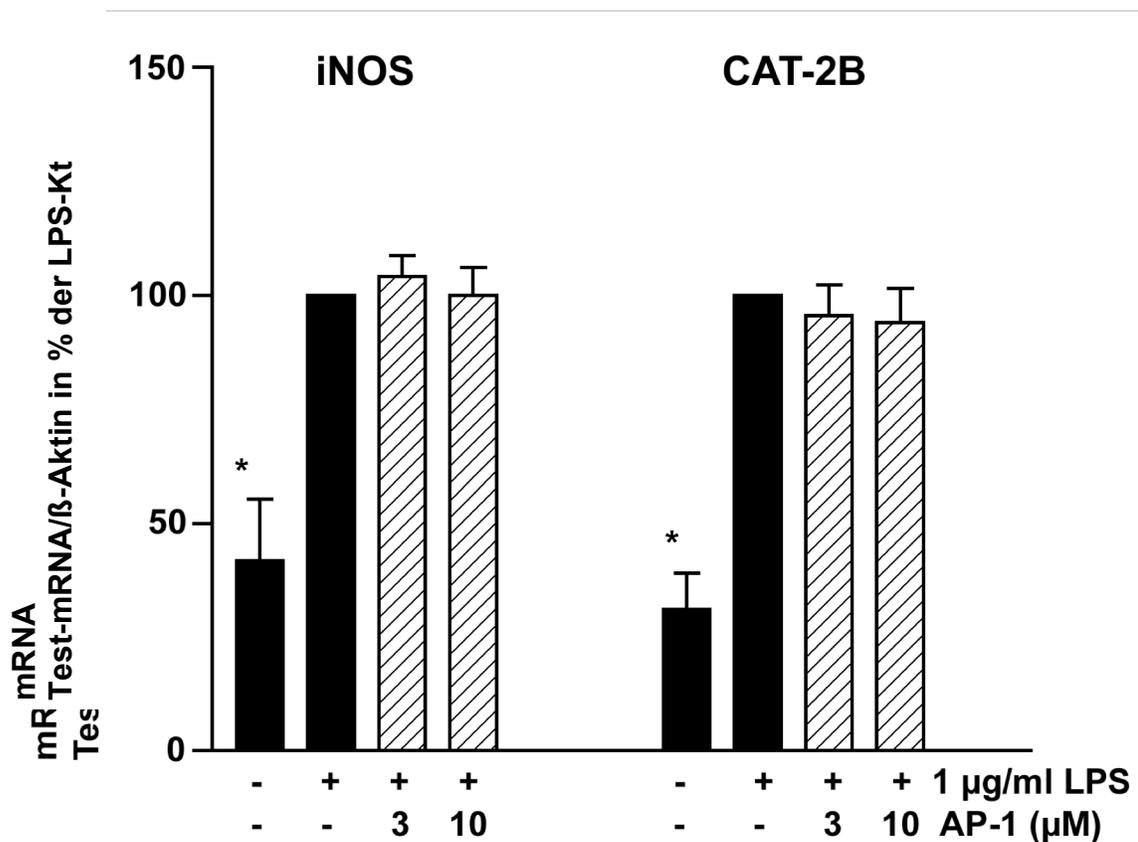


Abb.3: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das aktivierende Protein 1 (AP-1) (5`-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3`) auf die mRNA-Expression von iNOS und CAT-2B in RAM. Die Zellen wurden zuerst 4 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * p<0,05 Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, ermittelt mit gepaartem t-Test.

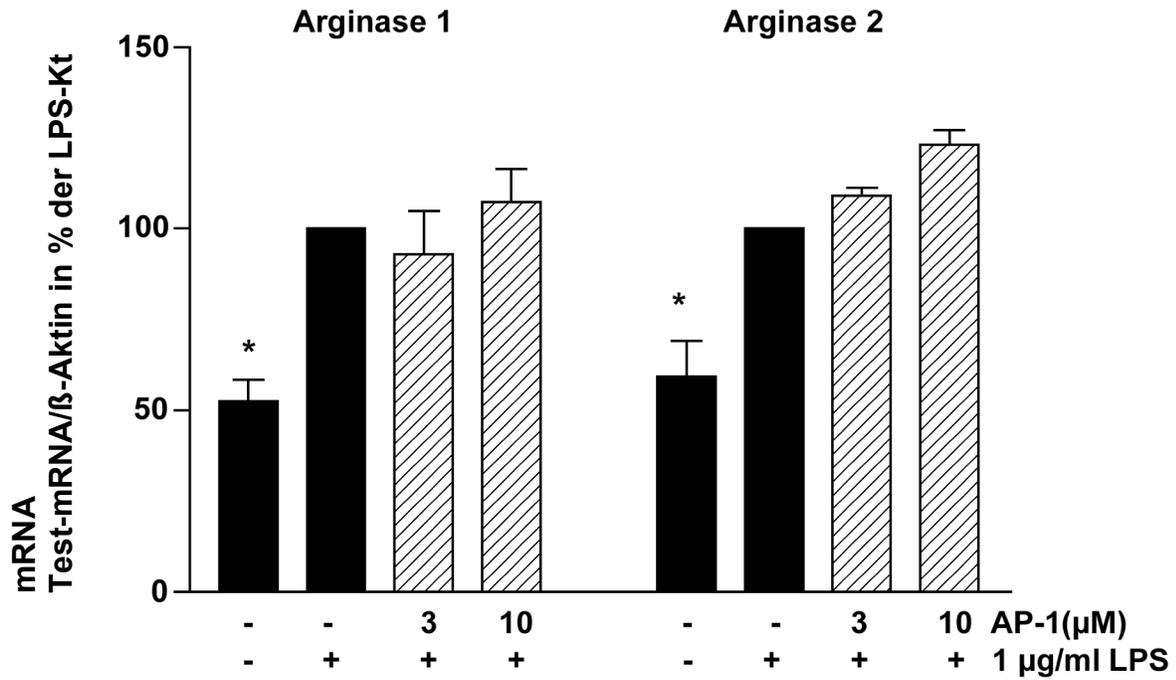


Abb.4: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das aktivierende Protein 1 (AP-1) (5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3') auf die mRNA-Expression von Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 4 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * $p < 0,05$ Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, ermittelt mit gepaartem t-Test.

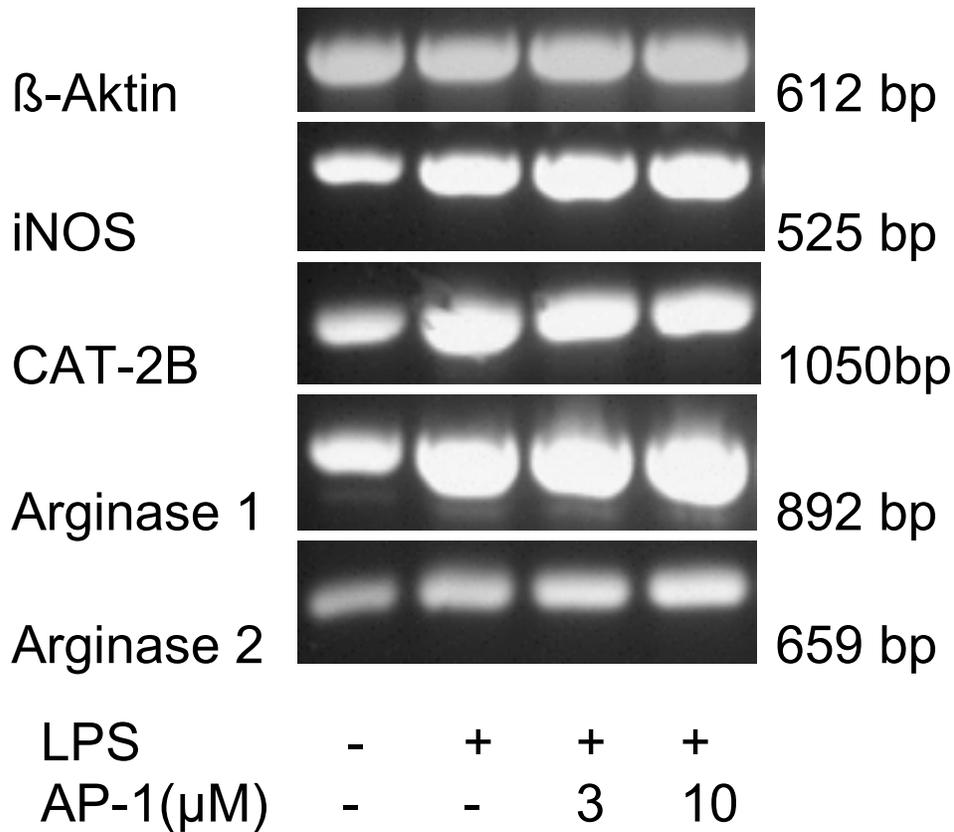


Abb.5: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das aktivierende Protein 1 (AP-1) (5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3') auf die mRNA-Expression von iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 4 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, eine RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die abgebildeten Banden stellen repräsentative Originale der Serie von Experimenten dar, die in Abb. 3 und 4 dargestellt sind dar.

Unter 4 h Vorinkubation mit AP-1-ODN wurden keine signifikanten Unterschiede zur LPS-Kontrolle ermittelt (Abb. 3 - 5). Der Vergleich der Kontrollen mit und ohne LPS zeigte einen Anstieg der iNOS-Expression durch LPS um > 100%. Das Ausgangsniveau der mRNA für iNOS betrug $42 \pm 14\%$, unter Inkubation mit 3 (10) μM AP-1-ODN und LPS $104 \pm 5\%$ ($100 \pm 6\%$) des Wertes mit LPS allein. Bezüglich CAT-2B zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Expression durch LPS

um > 100%. Es betrug das Ausgangsniveau $31 \pm 8\%$, unter Inkubation mit 3 (10) μM AP-1-ODN sowie LPS $96 \pm 7\%$ ($94 \pm 8\%$) der LPS-Kontrolle (Abb. 3, 5). Für die mRNA von Arginase 1 und 2 zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg unter LPS von beinahe 100%. Das Ausgangsniveau an mRNA für Arginase 1 betrug $53 \pm 6\%$ der LPS-Kontrolle, nach Zugabe von 3 (10) μM AP-1-ODN sowie LPS $93 \pm 12\%$ ($107 \pm 9\%$). Das mRNA-Niveau für Arginase 2 betrug $59 \pm 10\%$ der LPS-Kontrolle, und erreichte $109 \pm 2\%$ ($123 \pm 4\%$) nach Zusatz von 3 (10) μM AP-1-ODN (Abb. 4, 5).

3.2.1.2. 20 h Inkubation mit AP-1-Decoy-Desoxyoligonukleotiden

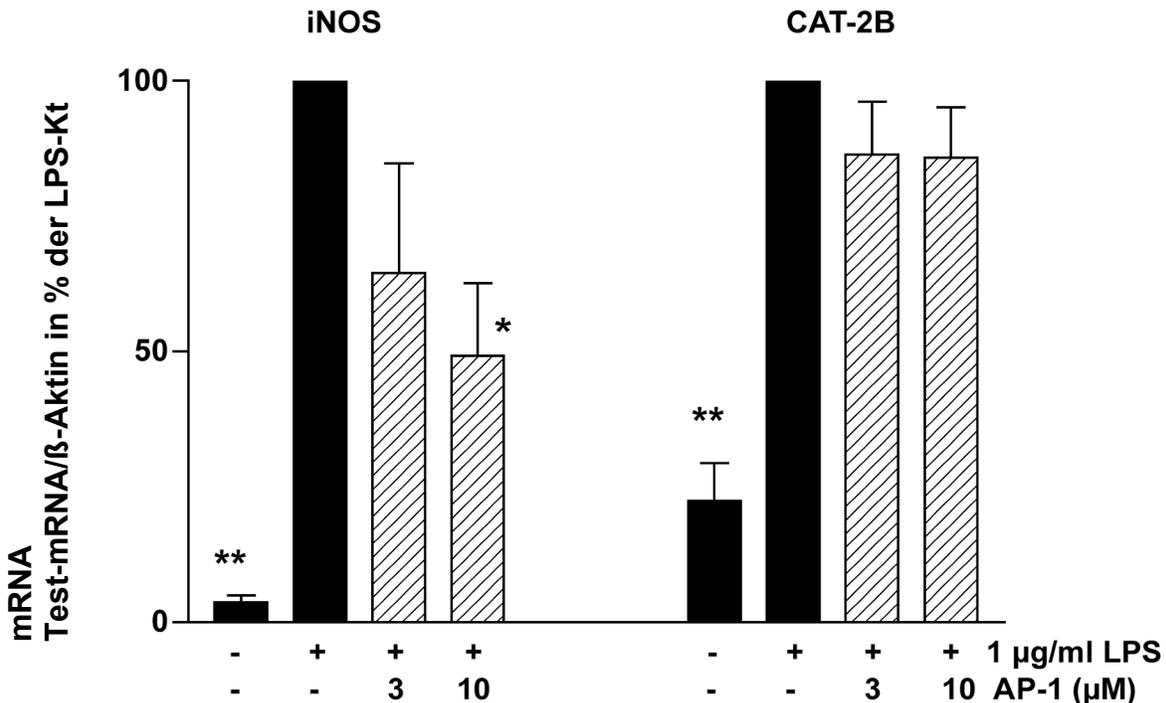


Abb.6: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das aktivierende Protein 1 (AP-1) (5`-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3`) auf die mRNA-Expression von iNOS und CAT-2B in RAM. Die Zellen wurden zuerst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (LPS), ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

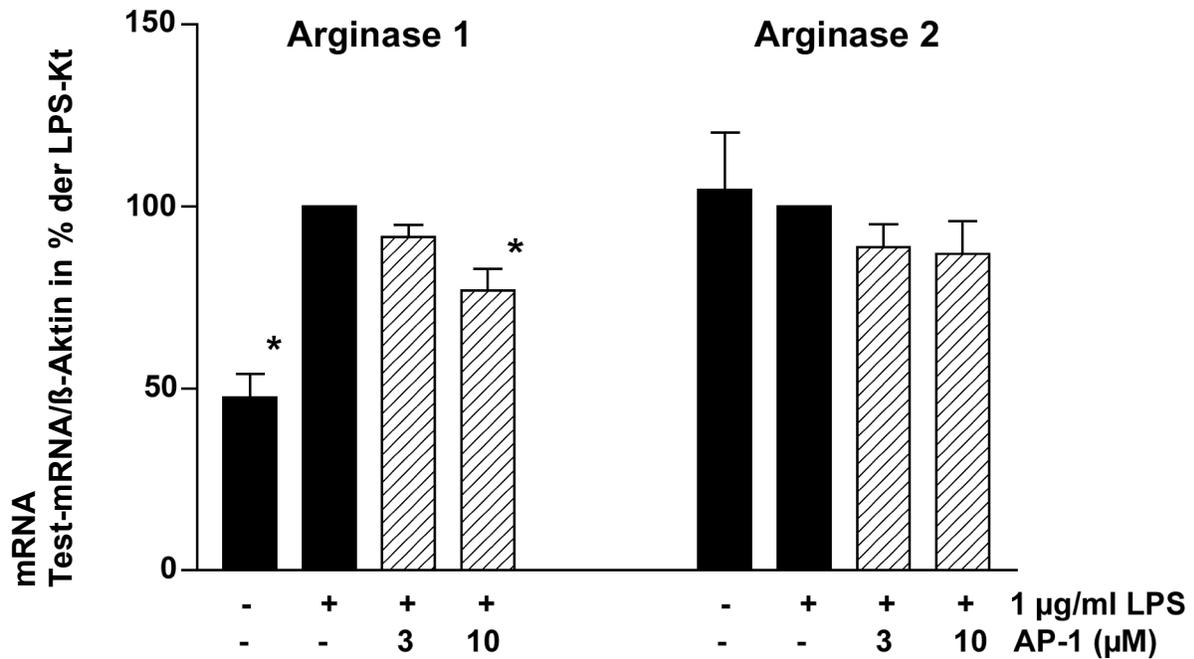


Abb.7: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das aktivierende Protein 1 (AP-1) (5`-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3`) auf die mRNA-Expression von Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * p<0,05 Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (LPS), ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

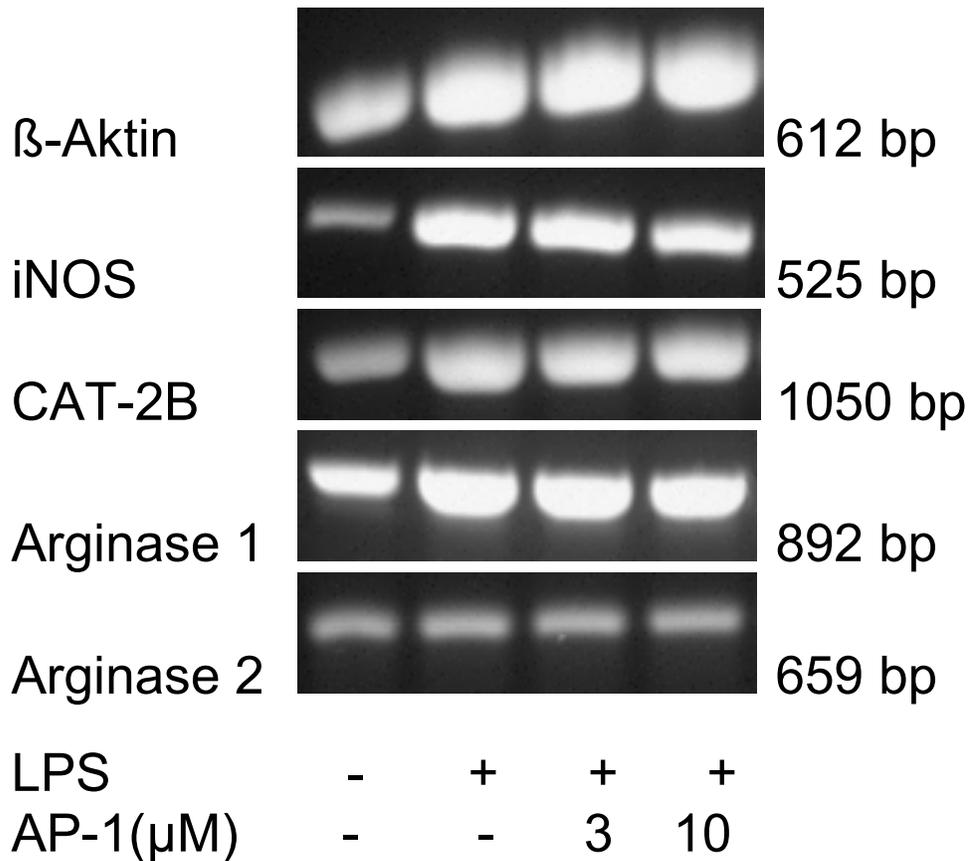


Abb.8: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das aktivierende Protein 1 (AP-1) (5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3') auf die mRNA-Expression von iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, eine RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die abgebildeten Banden stellen repräsentative Originale der selben Serie von Experimenten dar, die in Abb. 6 und 7 dargestellt sind.

Der Vergleich der Kontrollen mit und ohne LPS zeigte einen Anstieg der iNOS-Expression durch LPS auf ca. 2500%. Das Ausgangsniveau der mRNA für iNOS betrug $4 \pm 1\%$ der LPS-Kontrolle und sank unter 20 h Inkubation mit 3 (10) μM AP-1-ODN und 5 h mit LPS auf $65 \pm 20\%$ ($49 \pm 14\%^*$). Bezüglich mRNA für CAT-2B zeigte sich ein Anstieg durch LPS um $> 400\%$.

Für CAT-2B betrug das Ausgangsniveau $22 \pm 7\%$, unter Inkubation mit 3 (10) AP-1-ODN sowie LPS $86 \pm 10\%$ ($86 \pm 10\%$) der LPS-Kontrolle (Abb. 6, 8). Bezüglich mRNA für Arginase 1 zeigte sich ein Anstieg durch LPS um $> 100\%$. Das Ausgangsniveau an mRNA für Arginase 1 betrug $48 \pm 7\%$ der LPS-Kontrolle, nach Zugabe von 3 (10) μM AP-1-ODN sowie LPS $92 \pm 3\%$ ($77 \pm 6\%^*$). Bezüglich der mRNA für Arginase 2 zeigte sich kein signifikanter Anstieg unter LPS-Einwirkung. Das mRNA-Niveau für Arginase 2 betrug $105 \pm 16\%$ der LPS-Kontrolle, und erreichte $89 \pm 6\%$ ($87 \pm 9\%$) nach Zusatz von 3 (10) μM AP-1-ODN (Abb. 7, 8).

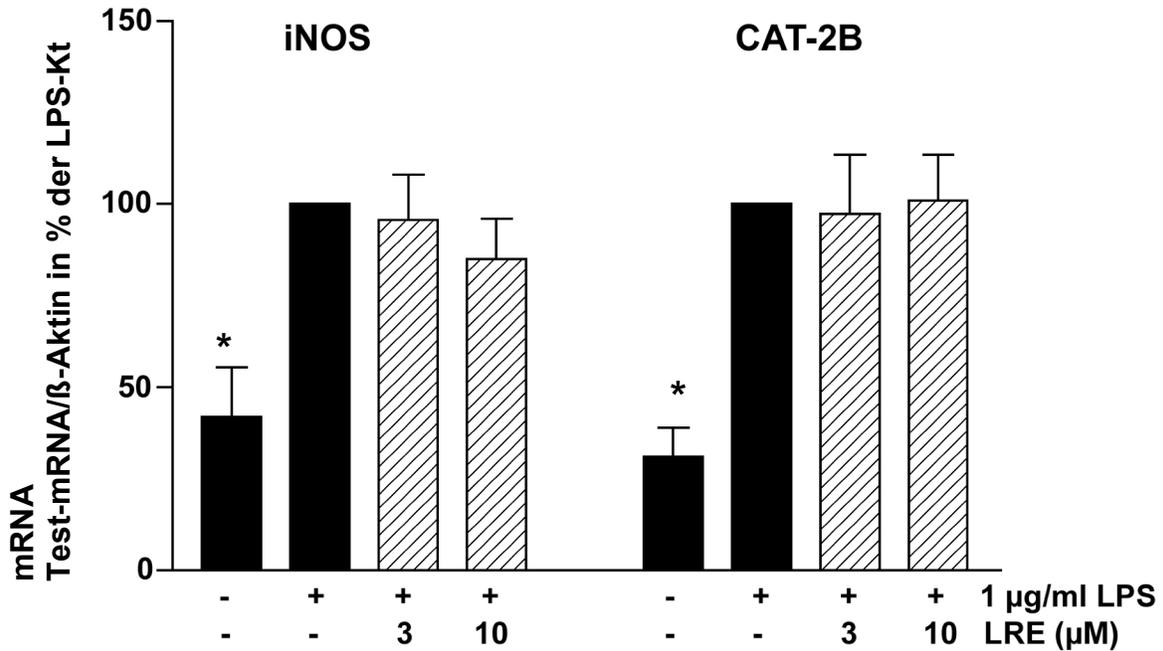
3.2.2. Einfluss von LRE_{AA}-Decoy-Desoxyoligonukleotiden3.2.2.1. 4 h Inkubation mit LRE_{AA}-Decoy-Desoxyoligonukleotiden

Abb.9: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (LRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von iNOS und CAT-2B in RAM. Die Zellen wurden zuerst 4 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * p<0,05 Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

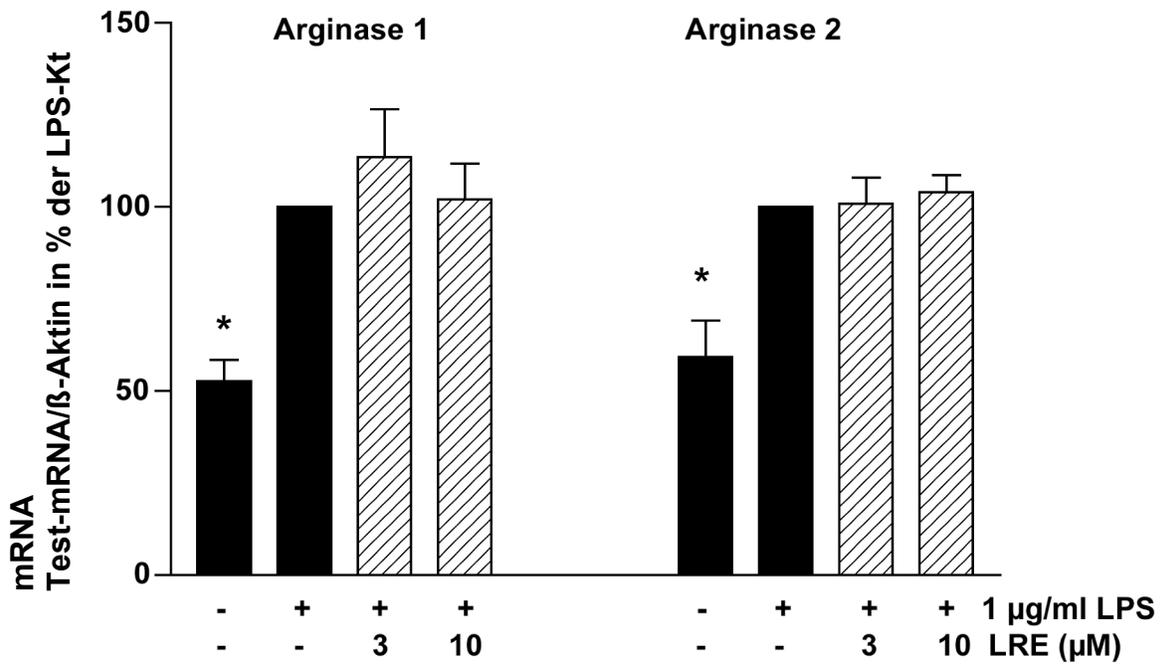


Abb.10: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (LRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 4 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * $p < 0,05$ Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle, ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

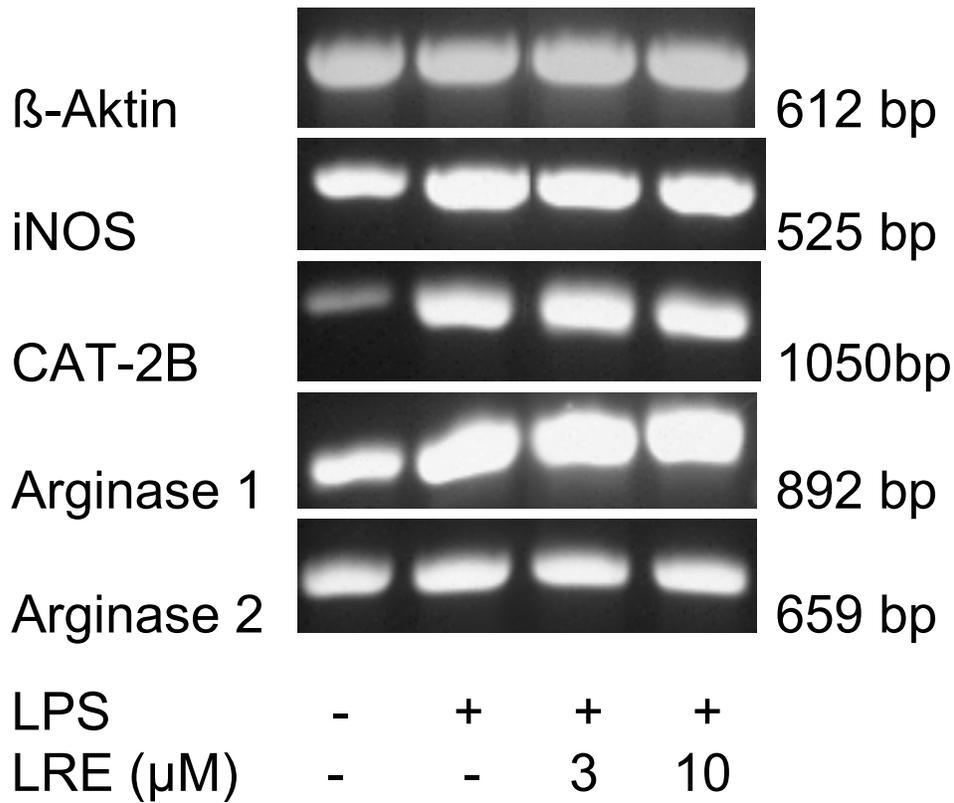


Abb.11: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (LRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 4 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, eine RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die abgebildeten Banden stellen repräsentative Originale der selben Serie von Experimenten wie in Abb. 9 und 10 dar.

Unter 4 h Vorinkubation mit LRE_{AA}-ODN wurden keine signifikanten Unterschiede zur LPS-Kontrolle ermittelt (Abb. 9 - 11). Unter LPS zeigte sich eine Steigerung der iNOS-Expression um > 100%. Das Ausgangsniveau der mRNA für iNOS betrug $42 \pm 14\%$ der LPS-Kontrolle, unter Inkubation mit 3 (10) μM LRE_{AA}-ODN und LPS wurden $96 \pm 12\%$ ($85 \pm 10,8\%$) erreicht. Bezüglich mRNA für CAT-2B zeigte sich unter LPS ein Anstieg um > 200%. Es betrug das Ausgangsniveau $31 \pm 8\%$, unter Inkubation mit 3 (10) LRE_{AA}-ODN sowie LPS 97

$\pm 16\%$ ($101 \pm 13\%$) der LPS-Kontrolle. Bezüglich mRNA für Arginase 1 und 2 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression um beinahe 100%. Das Ausgangsniveau an mRNA für Arginase 1 betrug $53 \pm 6\%$ der LPS-Kontrolle, nach Zugabe von 3 (10) μM LRE_{AA} -ODN sowie LPS $114 \pm 13\%$ ($102 \pm 10\%$). Das mRNA-Niveau für Arginase 2 betrug $59 \pm 10\%$ der LPS-Kontrolle, und erreichte nach Zusatz von 3 (10) μM LRE_{AA} -ODN $101 \pm 7\%$ ($104 \pm 5\%$).

3.2.2.2. 20 h Inkubation mit LRE_{AA} und mLRE_{AA} -Decoy-Desoxyoligonukleotiden

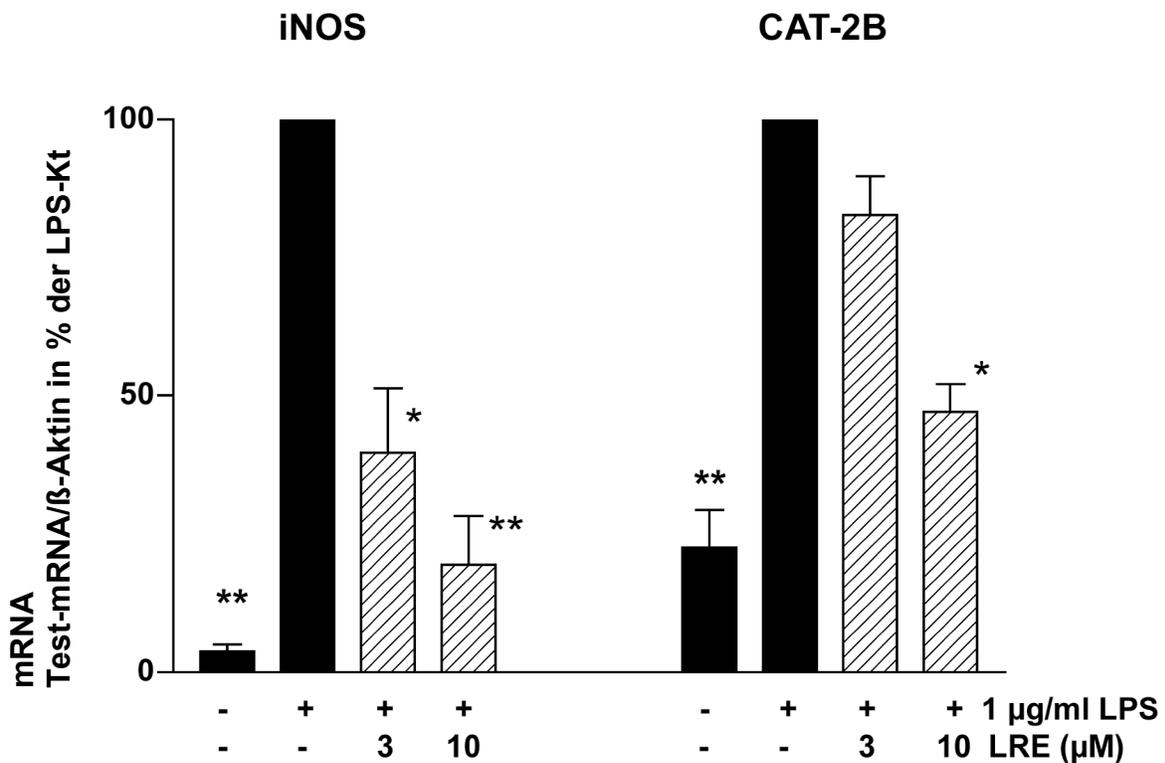


Abb.12: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (LRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von iNOS und CAT-2B in RAM. Die Zellen wurden zunächst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von $n=4$ Versuchen dar. Signifikanzen der Unterschiede * $p<0,05$ bzw. ** $p<0,01$ zur jeweiligen LPS-Kontrolle, ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

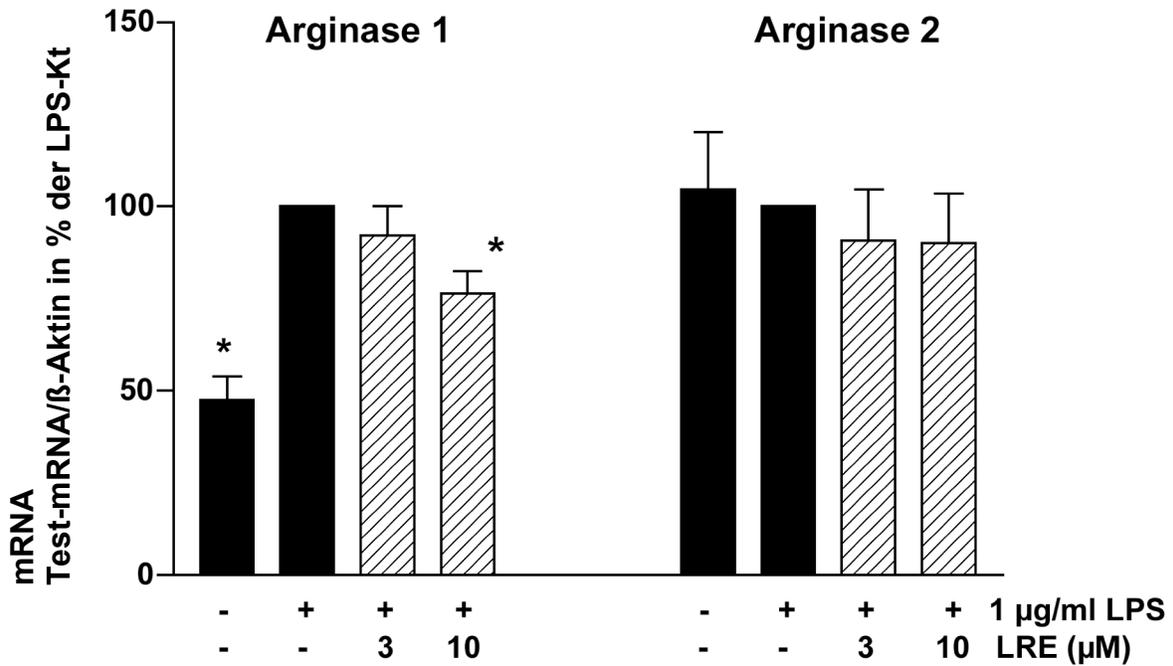


Abb.13: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (LRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zunächst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * $p < 0,05$ Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen LPS-Kontrolle, ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

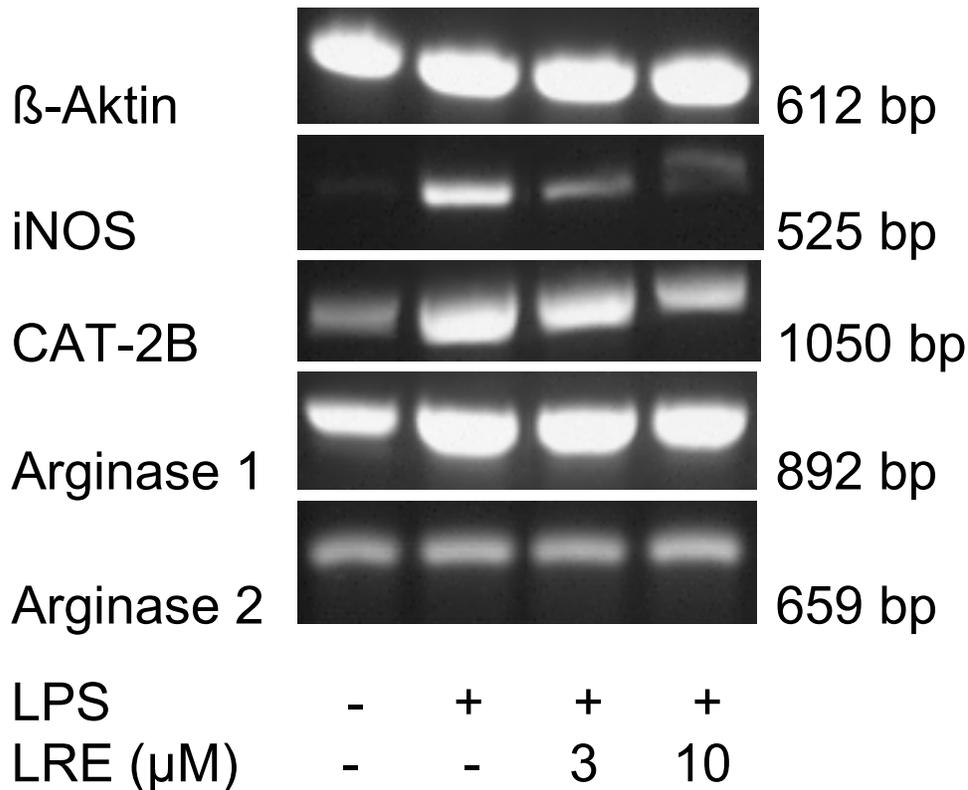


Abb.14: Effekt von LPS sowie ODN mit der Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (LRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA AAA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zunächst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, Produkte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die abgebildeten Banden stellen repräsentative Originale der selben Serie von Experimenten wie in Abb. 12 und 13 dar.

Der Vergleich der Kontrollen mit und ohne LPS zeigte einen Anstieg der iNOS-Expression durch LPS auf ca. 2500%. Das Ausgangsniveau der mRNA für iNOS betrug $4 \pm 1\%$ der LPS-Kontrolle, unter Inkubation mit 3 (10) μ M LRE_{AA}-ODN und LPS wurden lediglich $40 \pm 12\%^*$ ($19 \pm 9\%^{**}$) erreicht. Bezüglich CAT-2B zeigte sich unter LPS eine Steigerung der mRNA auf $>400\%$. Es betrug das Ausgangsniveau $22 \pm 7\%$, unter Inkubation mit 3 (10) LRE_{AA}-ODN sowie LPS $83 \pm 7\%$ ($47 \pm 5\%^*$) der LPS-Kontrolle. Bezüglich der mRNA für Arginase zeigte sich eine Steigerung um $>100\%$ unter LPS. Das Ausgangsniveau betrug $48 \pm 7\%$ der

LPS-Kontrolle, nach Zugabe von 3 (10) μM LRE_{AA}-ODN sowie LPS $92 \pm 8\%$ ($77 \pm 6\%$ *). Das mRNA-Niveau für Arginase 2 zeigte keinen signifikanten Anstieg unter LPS. Das Ausgangsniveau betrug $105 \pm 16\%$ der LPS-Kontrolle, und erreichte nach Zusatz von 3 (10) μM LRE_{AA}-ODN $91 \pm 14\%$ ($90 \pm 13\%$). Siehe hierzu auch die Abbildungen 9 – 11.

Wegen des gegenüber der LPS-Kontrolle signifikant niedrigeren Anstieges der mRNA-Expression für iNOS und CAT-2B bei denjenigen Proben, die mit LPS und 20 h mit LRE_{AA}-ODN inkubiert worden waren, wurde eine weitere Versuchsreihe mit modifizierten LRE_{AA}-ODNs gestartet. Hierzu wurden ODNs verwendet, welche in der von Xie et al., 1997 als typisch beschriebenen AA (TT)-Sequenz verändert waren. Hierdurch sollten unspezifische, nicht in der Basenabfolge begründete, Hemmeffekte der ODN ausgeschlossen werden.

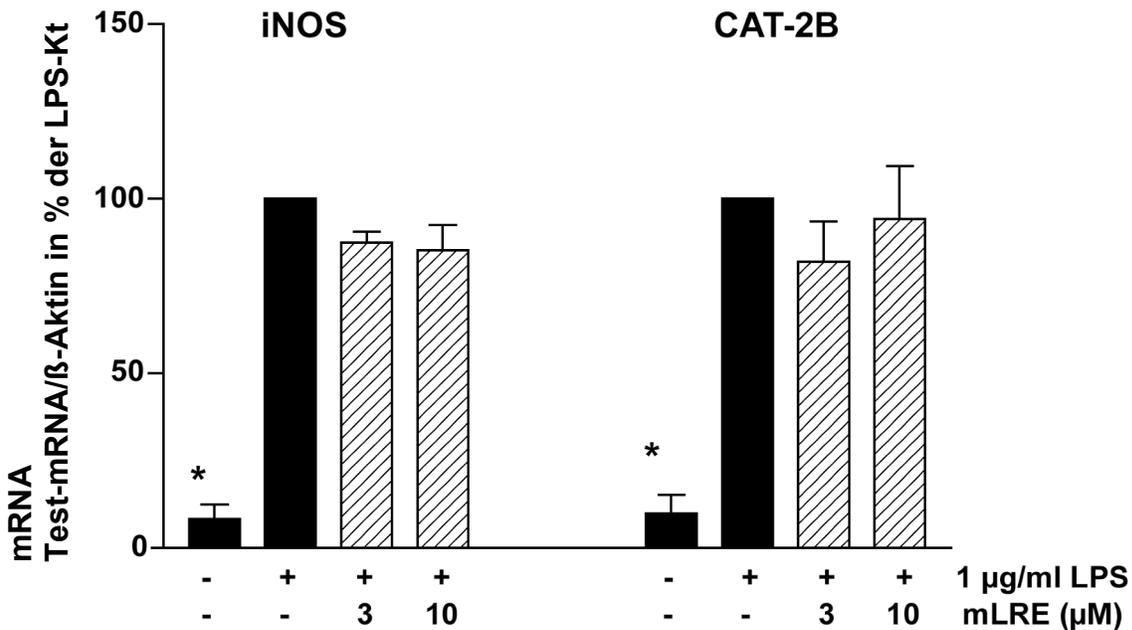


Abb.15: Effekt von LPS sowie ODN mit einer modifizierten Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (mLRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA CCA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von iNOS und CAT-2B in RAM. Die Zellen wurden zuerst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit

beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Die Diagramme stellen die Mittelwerte + SEM von n=4 Versuchen dar. * p<0,05 Signifikanzen der Unterschiede zur jeweiligen LPS-Kontrolle, ermittelt mit dem gepaarten t-Test.

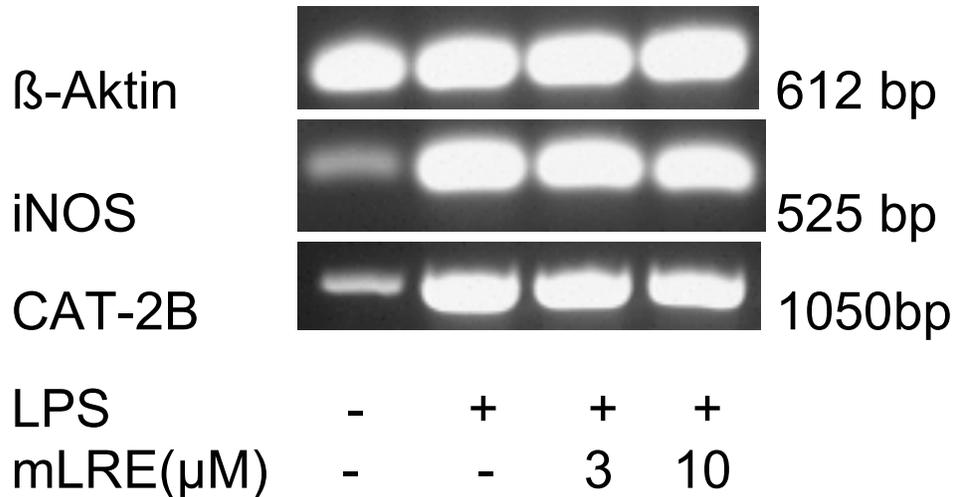


Abb.16: Effekt von LPS sowie ODN mit einer modifizierten Konsensussequenz für das LPS-responsive Element AA (mLRE_{AA}) (5'-CTT TAT GCA CCA CAG CTC TG-3') auf die mRNA-Expression von iNOS, CAT-2B sowie Arginase 1 und 2 in RAM. Die Zellen wurden zuerst 20 h in An- oder Abwesenheit von ODN und anschließend 5 h mit, beziehungsweise ohne LPS inkubiert. Daraufhin wurde die RNA präpariert, eine RT-PCR mit jeweils spezifischen Primerpaaren durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die abgebildeten Banden stellen repräsentative Originale der selben Serie von Experimenten wie in Abb. 15 dar.

Bezüglich der mRNA für iNOS zeigte sich unter LPS ein Anstieg um > 1000%. Das Ausgangsniveau betrug hier $8 \pm 4\%$ der LPS-Kontrolle, unter Inkubation mit 3 (10) μ M LRE_{AA}-ODN und LPS wurden $87 \pm 3\%$ ($85 \pm 7\%$) erreicht. Bezüglich mRNA für CAT-2B zeigte sich ein Anstieg um ca. 900%. Es betrug das Ausgangsniveau $10 \pm 5\%$, unter Inkubation mit 3 (10) LRE_{AA}-1-ODN sowie LPS $82 \pm 12\%$ ($94 \pm 15\%$) der LPS-Kontrolle. Die geringen Unterschiede waren nicht signifikant (Abb. 15 – 16).

4.0. Diskussion

4.1. Zeitabhängige Stimulation der iNOS-Expression nach Stimulation mit LPS

Unsere Untersuchungen zeigten erneut die erhöhte Expression der iNOS nach Stimulation mit LPS. Diese zeigte sich in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen (Xie et al., 1994; Förstermann und Kleinert, 1995; Klasen et al., 2001) bereits 1 h und noch deutlicher 5 h nach Zugabe von 1 µg/ml LPS.

4.2. Einflüsse durch LRE_{AA}-ODN

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des neuen LPS-responsiven Elementes LRE_{AA} für die LPS vermittelte Induktion des CAT-2B zu untersuchen. Diese regulatorische Sequenz war 1997 erstmals für den murinen iNOS-Promotor in der Zelllinie RAW 264.7 als essentiell beschrieben worden (Xie, 1997). Sie besteht aus der OCT-ähnlichen Basenfolge ATGCAAAA, bei welcher insbesondere die mittleren zwei, 20 bp downstream der proximalen NFκB-Bindungsstelle gelegenen, Adenosinreste von funktioneller Bedeutung sind. Es gibt Hinweise, das NFκB, Oct-1, HMG-I(Y) und eventuell weitere, bisher nicht identifizierte, beziehungsweise nicht gesicherte Proteine in Anwesenheit beider Bindungsstellen (NFκBd und LRE_{AA}) dort LPS-induziert einen Enhanceosome-Komplex bilden, welcher zu verstärkter Expression der iNOS führt (Xie et al., 1994; Xie, 1997; Perrella et al., 1999; Darville et al., 2004). Die gleiche Sequenz findet sich auch im Promotorbereich des iNOS Gens der Ratte 25 bp downstream der NF-κB-Bindungsstelle und 55 bp upstream des Transkriptionsstarts (Beck und Sterzel, 1996).

Darüber hinaus haben viele Arbeiten eine parallele Regulation von iNOS und CAT-2B durch verschiedene Substanzen belegt. So werden beide in ihrer Expression durch LPS und IFN-gamma stimuliert (Hammermann et al., 2000), während sie sowohl durch Kortikoide als auch durch Spermin inhibiert werden

(Mössner et al., 2001; Hammermann et al., 2000). Für die Induktion beider Gene ist weiterhin NF- κ B notwendig (Xie et al., 1994; Hammermann et al., 2000; Closs et al., 2000; Ables et al., 2001). Jedoch zeigten Beck und Sterzel (1996) eine verringerte iNOS-Induktion durch IL-1 β und TNF-alpha bei gleichzeitiger Inkubation mit Endothelin-1, das seinerseits keine Auswirkungen auf das Bindungsmuster von NF- κ B aufwies. Dies, sowie die durch Cycloheximid erzielbare Hemmung der mRNA-Synthese von iNOS und CAT-2B (Hammermann et al., 2000) weisen ebenfalls darauf hin, dass neben NF- κ B, das cytosolisch als inaktiver Komplex bereits vorliegt (Jacobs und Harrison, 1998) noch weitere, neusynthetisierte Faktoren an der Induktion dieser Gene beteiligt sein müssen. Als mögliche Kandidaten kommen unter anderen Oct-bindende Proteine (Goldring et al., 1996) oder AP-1 (Guo et al., 2002) in Frage.

Aufgrund dieser Ergebnisse ergab sich die Fragestellung, ob eine Funktion des LRE_{AA} bei der iNOS-Induktion sich auch für die Ratte zeigen lässt, und ob diese Form der Regulation ebenfalls parallel für die Induktion von iNOS und CAT-2B gilt.

Bei 20 h Inkubation mit ODN mit LRE_{AA}-Sequenz vor der Stimulation mit LPS zeigte sich eine signifikante (3 μ M LRE_{AA}-ODN) bis hoch signifikante (10 μ M LRE_{AA}-ODN) Reduktion des durch LPS induzierten Anstieges der iNOS-mRNA. Bei lediglich 4 h Inkubation mit LRE_{AA}-ODN vor der Stimulation mit LPS fanden wir hingegen nur geringe, nicht signifikante Verringerungen des mRNA-Gehaltes für iNOS gegenüber der LPS-Kontrolle. Bei 20 h Inkubation mit in der Basensequenz modifizierten LRE_{AA}-ODN fand sich ebenfalls eine nur geringe und nicht signifikante Reduktion im intrazellulären mRNA-Gehalt für iNOS. Die Konzentrationsabhängigkeit des bei 20 h erzielten Hemmeffektes auf die iNOS-Expression und der Befund, dass mLRE_{AA}-ODN, welche in den mittleren beiden Adenosinresten gegenüber den LRE_{AA}-ODN verändert worden waren, nur zu minimaler Reduktion derselben führten, werten wir als weiteren Beleg für die essentielle Bedeutung des LRE_{AA} für die LPS-vermittelte iNOS-Induktion (Beck und Sterzel, 1996; Xie, 1997). Die nur geringen Auswirkungen von 4 h Inkubation mit LRE_{AA}-ODN erklären wir durch eine nicht ausreichende Aufnahme dieser

ODN binnen 4 h. Diese könnten daher zum Zeitpunkt der LPS-Stimulation intrazellulär beziehungsweise intranukleär noch in nicht ausreichender Konzentration vorliegen. Die sehr geringen Auswirkungen von 20 h Inkubation mit mLRE_{AA}-ODN könnten sowohl zufällig als auch durch eine trotz Veränderung der 2 wesentlichen Adenosinreste erhaltenen Rest-Bindungsfähigkeit der ODN am LRE_{AA} auftreten. Ebenfalls möglich ist die Existenz unspezifischer, nicht in der Sequenz der ODN, sondern zum Beispiel durch die Phosphorothioat-Reste, begründeter Hemmeffekte auf die Expression der iNOS.

Eine signifikante Reduktion des mRNA-Gehaltes für CAT-2B um die Hälfte fanden wir lediglich nach 20 h Inkubation mit 10 µM LRE_{AA}-ODN. Sowohl bei Inkubation mit 3 µM LRE_{AA}-ODN für 20 h als auch bei 4 h mit LRE_{AA}-ODN und 20 mit mLRE_{AA}-ODN zeigten sich nur geringe, nicht signifikante Veränderungen.

In der Zwischenzeit nach Abschluss unserer Experimente wurde im Rahmen des ‚Rat Genom Project‘ auch die Promotorregion des rCAT-2 auf Chromosom 16 sequenziert. In unserem Labor ist darüber hinaus die Promotorregion des rCAT-2B genauer eingegrenzt und der Transkriptionsstart mittels RACE-PCR-Technik bestimmt worden. Dieser befindet sich bei Position 15 479 554 unter der Akzessionsnummer NW 047473 (Brunn et. al., in den Daten bereits dokumentierte Sequenz).

Passend zu unseren Ergebnissen fand sich in der Analyse der Promotorregion des rCAT-2 mit dem Programm MatInspector auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren kein LRE_{AA}-Element. Die Analyse zeigte allerdings 4 potentielle OCT-1-Bindungsstellen (122, 444, 1151 und 1387 bp upstream des Transkriptionsstartes), welche typischerweise eine dem LRE_{AA} ähnliche Poly-A-Region enthalten. Im Gegensatz zur Promotorregion der iNOS, die ja in räumlicher Nähe zum LRE_{AA}-Element eine für die Geninduktion essentielle NF-κB-Bindungsstelle enthält (Xie, 1997), fand sich bei der Analyse jener des CAT-2 keine Bindungsstelle für NF-κB. Es bleibt offen, ob die gemessene Reduktion der Expression von CAT-2B auf verringerte Bindung an diese potentiellen Oct-1-

Bindungsstellen oder andere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zurückgeht. Eine Erklärung durch unspezifische Effekte wird jedoch durch unsere Daten insofern nicht nahegelegt, als die beschriebenen Veränderungen bei gleicher Versuchsanordnung mit mLRE_{AA}-ODN nicht beobachtet wurden.

Aufgrund ihrer Beteiligung am Argininstoffwechsel untersuchten wir bei unseren Proben auch die Expression von Arginase 1 und 2. Die Analyse der zugehörigen Promotorregionen bis 2000 bp upstream des Transkriptionsstartes (Ohtake et al., 1988; Shi et al., 1998) auf potentielle Bindungsstellen zeigte kein LRE_{AA}-Element. Es fanden sich jedoch je 8 potentielle Bindungsstellen für Oct-1, von denen einige in nur einer Base von der Sequenz des LRE_{AA} abweichen, darunter solche Bindungsstellen, die in der für die Bindung besonders bedeutsamen Poly-A-Sequenz (Xie, 1997) identisch zum LRE_{AA} sind.

In Bezug auf die Expression von Arginase 1 zeigte sich unter Stimulation mit LPS die bereits vorbeschriebene Erhöhung der mRNA-Expression auf das Doppelte (Salimuddin et al., 1999; Klasen et al., 2001). Dieser Anstieg trat ebenfalls bei vorheriger Inkubation mit ODN auf. Als Ausnahme fand sich lediglich nach 20 h Inkubation mit 10 µM LRE_{AA} eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression für Arginase 1 um knapp ein Viertel. Angesichts der Existenz LRE_{AA}-ähnlicher Elemente könnte eine spezifische Hemmung durch LRE_{AA}-ODN dafür verantwortlich sein, die aufgrund der geringen Abnahme dann für einen nur geringen Beitrag dieser Elemente zur gesamten Induktion der Arginase 1 durch LPS spräche. Ebenfalls zu diskutieren ist jedoch auch eine Begründung durch unspezifische Effekte der ODN.

Weiterhin unterblieb bei der Versuchsserie mit 10 µM LRE_{AA}-ODN der Anstieg der Arginase 2-mRNA. Bereits frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass die LPS-vermittelten Effekte auf die mRNA für Arginase 2 variabel und nicht durch vermehrte Bildung, sondern durch eine erhöhte Haltbarkeit dieser mRNA bedingt sind (Klasen et al., 2001).

Ein nicht ausreichender LPS-Stimulus liegt angesichts regelrechter Stimulation von iNOS und CAT-2B in dieser Serie nicht vor.

4.3. Beeinflussung der Genexpression durch AP-1-ODN

Bei vielen im Rahmen einer inflammatorischen Genantwort durch LPS induzierten Genen existiert mehr als ein LPS-responsives Element (Camhi et al., 1998; Guha et al., 2002). Auch im Fall der iNOS gibt es, wie unter 4.3. beschrieben, Hinweise, dass neben NF- κ B weitere Faktoren an der LPS vermittelten Induktion beteiligt sind. Eine Vielzahl von Arbeiten kommt zu dem Ergebniss, dass LPS-Stimulation von Makrophagen binnen 30-60 min zu einer raschen Erhöhung der Expression von c-fos und c-jun führt. Gleichzeitig steigt die Formierung des daraus gebildeten AP-1 sowie dessen DNS-Bindungsfähigkeit (Introna et al., 1986; Kaminska et al., 1992; Tengku-Muhammad et al., 2000; Ye und Liu, 2001; Guo et al., 2002). Weiterhin zeigten Jeon et al. (2000) bei der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7, dass die LPS-vermittelte Induktion von IL-1 β durch eine Dexamethason-vermittelte Hemmung der Aktivierung von AP-1 und NF- κ B inhibiert wurde. Da IL-1 β seinerseits zu erhöhter Expression der iNOS führt, könnte dies einen Mechanismus darstellen, über den AP-1 auf die Expression von iNOS einwirkt. Weiterhin wurden im murinen iNOS-Promotor Bindungsstellen für AP-1 nachgewiesen (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1994) und Marks-Konczalik et al. (1998) belegten, dass AP-1 an der Induktion der humanen iNOS durch einen CytoMix aus IL-1 β , IFN-gamma und TNF-alpha beteiligt ist.

Auf der anderen Seite existieren jedoch auch Befunde an Sprague Dawley-Ratten, die gegen eine AP-1-Aktivierung durch LPS alleine sprechen, diese jedoch bei gleichzeitiger Hyperoxie zeigen (Pepperl et al., 2001). Andere Untersuchungen sprechen für eine verringerte iNOS-Expression durch LPS vermittelte AP-1-Aktivierung (Kizaki et al., 2001).

Auch hier untersuchten wir aufgrund der häufig parallelen Regulation neben der Beeinflussung der iNOS auch jene des CAT-2B.

Die Bestimmung von mRNA für c-jun und c-fos erbrachte in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der veröffentlichten Untersuchungen einen Anstieg bereits nach 30-60 min gegenüber nicht mit LPS inkubierten zeitkorrigierten Kontrollproben.

Bei den anschließenden Untersuchungen mit ODN zeigte sich nach 20 h Inkubation mit 10 μ M AP-1-ODN vor Stimulation mit LPS eine signifikante Verringerung der mRNA für iNOS um die Hälfte. Angesichts der obengenannten zahlreichen Belege für eine Beteiligung von AP-1 an der LPS vermittelten iNOS-Induktion ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine durch AP-1-ODN vermittelte Hemmung zurückzuführen und weist auf eine wesentliche Funktion für AP-1 in diesem Zusammenhang hin. Auch der Befund, dass im Gegensatz dazu die CAT-2B-Expression durch 20 h Inkubation mit AP-1-ODN nicht beeinträchtigt wurde, spricht gegen einen unspezifischen Effekt auf die mRNA-Produktion.

Die LPS vermittelte Induktion des CAT-2B findet sich mit geringer, nicht signifikanter Abschwächung auch bei den vor LPS-Stimulation mit AP-1-ODN inkubierten Proben. Diese schwach ausgeprägten Hemmungen der CAT-2B-Induktion führen wir am ehesten auf unspezifische Effekte durch die ODN zurück, obwohl die Sequenzanalyse des putativen CAT-2-Promotors mit dem Programm MatInspector die Existenz zweier möglicher AP-1-Bindungsstellen 1299 bp und 2026 bp upstream des Transkriptionsstarts zeigte.

Aufgrund ihrer Beteiligung am Argininstoffwechsel untersuchten wir bei allen Proben auch die Expression von Arginase 1 und 2. Die Analyse der zugehörigen Promotorregionen bis 2000 bp upstream des Transkriptionsstartes (Ohtake et al., 1988; Shi et al., 1998) auf potentielle Bindungsstellen zeigte 2 (Arginase 1) beziehungsweise 1 (Arginase 2) Bindungsstelle für AP-1.

Der mRNA-Gehalt für Arginase 1 und 2 ist in Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen (Klasen et al., 2001) gegenüber der LPS-freien Kontrolle etwa verdoppelt. Dies gilt für die Versuche mit und ohne Zugabe von ODN vor Inkubation mit LPS. Lediglich die Expression der Arginase 1 zeigt nach 20 h Inkubation mit 10 μ M AP-1-ODN und anschließend 5 h mit LPS eine signifikante Reduktion um ein Viertel. Diese könnte sich trotz der Existenz potentieller AP-1-

Elemente in der Promotorregion aufgrund ihres geringen Ausmaßes am ehesten ebenfalls durch unspezifische Hemmeffekte der ODN erklären.

4.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend interpretieren wir die vorliegenden Daten als deutlichen Beleg für die Beteiligung des LRE_{AA} für die LPS-vermittelte iNOS-Induktion auch bei Alveolarmakrophagen von Sprague Dawley-Ratten. Desgleichen konnte die Beteiligung von AP-1 an der LPS-vermittelten Induktion der iNOS in diesem Zellsystem belegt werden.

Eine Rolle von LRE_{AA} oder AP-1 im Rahmen der vermehrten Expression des CAT-2B unter Einfluss von LPS geht aus unseren Daten jedoch nicht hervor.

5.0. Zusammenfassung

Xie et al. (1997) hatten im iNOS (induzierbare NO-Synthase)-Promotor der Maus das neue LPS (Lipopolysaccharid)-responsive Element LRE_{AA} gefunden und belegt, dass dies eine essentielle regulatorische Sequenz für die LPS-vermittelte Induktion der iNOS ist. Diese Sequenz findet sich auch im iNOS-Promotor der Ratte. Da außerdem eine Vielzahl von Daten vorliegt, die die parallele Regulation von iNOS und CAT-2B (Kationischer Aminosäuretransporter 2B) unterstreichen, untersuchten wir die Bedeutung von LRE_{AA} sowohl für die LPS-vermittelte Induktion der iNOS wie auch diejenige des CAT-2B der Ratte. Da es weiterhin Hinweise auf die Beteiligung von AP-1 (aktivierendes Protein 1) gibt, wurde auch dieses in die Untersuchung einbezogen. Wir verwendeten primäre Rattenalveolarmakrophagen, für die eine Induktion von iNOS und CAT-2B durch LPS bekannt ist. Die Zellen der Kontrolle wurden 5 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert und anschließend mit Hilfe von RT-PCR auf ihren Gehalt an mRNA für iNOS und CAT-2B untersucht. Die anderen Zellen wurden zusätzlich vor der Zugabe von LPS für 4 h oder 20 h mit 3 oder 10 μM ODN (Decoy-Desoxyoligonukleotide) inkubiert. Wir verwendeten dafür ODN mit der Konsensussequenz von LRE_{AA} beziehungsweise AP-1.

Bei 4 h Inkubation mit ODN vor Zugabe von LPS zeigten sich keinerlei signifikante Veränderungen.

Bei 20 h Inkubation mit ODN mit der Sequenz des LRE_{AA} fand sich bei den Proben mit 3 μM ODN eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression für iNOS auf $40 \pm 12\%$ und bei den Proben mit 10 μM ODN eine hochsignifikante Verringerung auf $19 \pm 9\%$ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ODN. Bezüglich der Expression von mRNA für CAT-2B zeigte sich in Anwesenheit von 3 μM LRE_{AA} -ODN eine nichtsignifikante Reduktion auf $83 \pm 7\%$, in Anwesenheit von 10 μM LRE_{AA} -ODN eine signifikante Reduktion auf $47 \pm 5\%$.

Um bei diesen konzentrationsabhängigen Effekten der LRE_{AA} -ODN solche Effekte, die in der Sequenz der ODN begründet liegen, von

sequenzunabhängigen Effekten unterscheiden zu können, wiederholten wir diese Versuchsanordnung mit ODN, deren Sequenz in den 2 als essentiell beschriebenen Basen modifiziert worden war (mLRE_{AA}-ODN). Bei 20 h Inkubation mit mLRE_{AA}-ODN vor Zugabe von LPS fand sich nur eine geringfügige, nicht signifikante und nicht konzentrationsabhängige Reduktion der mRNA für iNOS. Bezüglich der mRNA für CAT-2B fanden sich ebenfalls nur geringfügige, nicht signifikante Verringerungen der Konzentration.

Aufgrund der deutlichen, konzentrationsabhängigen Reduzierbarkeit der Expression von mRNA für iNOS durch ODN mit der Sequenz des LRE_{AA}, die darüber hinaus bei Inkubation mit mLRE_{AA} unterbleibt, scheint LRE_{AA} ein essentielles regulatorisches Element auch für die iNOS der Ratte zu sein. Dafür spricht zusätzlich das Vorhandensein eines solchen Elementes im Promotor des iNOS-Gens der Ratte, das sich zudem wie im murinen iNOS-Promotor in räumlicher Nähe zu einer NF- κ B bindenden Sequenz befindet.

Die Untersuchung des CAT-2B-Promotors der Ratte zeigte keine solche Sequenz. Außerdem ist der Hemmeffekt von LRE_{AA}-ODN auf die Induktion von CAT-2B deutlich schwächer ausgeprägt. Es scheint also, dass LRE_{AA} als regulatorische Sequenz hier nicht von Bedeutung ist. Da sich bei Inkubation mit 10 μ M LRE_{AA}-ODN jedoch signifikante Effekte auf die mRNA-Expression für CAT-2B zeigen, die unter Inkubation mit mLRE_{AA}-ODN ausbleiben, ist hier auch ein, quantitativ weniger bedeutender, Beitrag eines LRE_{AA}- oder LRE_{AA}-ähnlichen Elementes möglich.

Bei 20 h Inkubation mit ODN gegen AP-1 zeigte sich bei den Proben mit 3 μ M ODN eine nicht signifikante Verringerung der Induktion von iNOS auf $65 \pm 20\%$ und bei den Proben mit 10 μ M ODN eine signifikante Verringerung auf $49 \pm 14\%$ im Vergleich zu den Kontrollen ohne ODN. Bezüglich des CAT-2B zeigte sich hierbei nur eine geringfügige, nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression, die keine Abhängigkeit von der Konzentration der AP-1-ODN aufwies. Zusammen mit unseren Voruntersuchungen, die zusätzlich einen frühen, transienten Anstieg der AP-1-Komponenten c-jun und c-fos nach Zusatz von LPS

zeigten, spricht dies für eine Beteiligung von AP-1 bei der LPS-vermittelten Induktion der iNOS, nicht jedoch des CAT-2B.

Unsere Untersuchungen zeigten, im Gegensatz zu der meist parallelen Regulation, im Fall von AP-1 und LRE_{AA} differente Signalwege bei der Induktion von iNOS und CAT-2B.

6.0. Literaturverzeichnis

(1) <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1998/index.html> (15.01.2007)

- ABLES, G.P., HAMASHIMA, N. & WATANABE, T., Analysis of genetic factors associated with nitric oxide production in mice. *Biochem. Genet.* 2001, **39**:379-394.
- ALBINA, J.E., ABATE, J.A. & HENRY, W.L. JR, Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN- γ in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol.* 1991, **147**:144-148.
- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E. & KNOWLES, R.G., Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001, **357**:593-615. Review.
- AMEREDDES, B.T., ZAMORA, R., GIBSON, K.F., BILLIAR, T.R., DIXON-MCCARTHY, B., WATKINS, S. & CALHOUN, W.J., Increased nitric oxide production by airway cells of sensitized and challenged IL-10 knockout mice. *J. Leukoc. Biol.* 2001, **70**:730-736.
- BARNES, P.J. & LIEW, F.Y., Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today* 1995, **16**:128-130.
- BAYDOUN, A.R., BOGLE, R.G., PEARSON, J.D. & MANN, G.E., Selective inhibition by dexamethasone of induction of NO synthase, but not of induction of L-arginine transport, in activated murine macrophage J774 cells. *Br. J. Pharmacol.* 1993, **110**:1401-1406.
- BAYDOUN, A.R., WILEMAN, S.M., CAROLINE, P., WHEELER-JONES, D., MARBER, M.S., MANN, G.E., PEARSON, J.D. & CLOSS, E.I., Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 1999, **344**:265-272.
- BECK, K.F. & STERZEL, R.B., Cloning and sequencing of the proximal promoter of the rat iNOS gene: activation of NF- κ B is not sufficient for transcription of the iNOS gene in rat mesangial cells. *FEBS Letters* 1996, **394**:263-267.
- BECK, K.-F., EBERHARDT, W., FRANK, S., HUWILER, A., MEßMER, U.K., MÜHL, H. & PFEILSCHIFTER, J., Inducible NO Synthase: Role In cellular signalling. *J. Exp. Biol.* 1999, **202**:645-653.
- BERTRAN, J., WERNER, A., MOORE, M.L., STANGE, G., MARKOVICH, D., BIEBER, J., TESTAR, X., ZORZANO, A., PALACIN, M. & MURER H., Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, **89**:5601-5605.
- BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., PAIK, J., XIE, Q.W. & NATHAN, C., Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 1994, **55**:227-233.

- BRUNN, G., HEY, C., WESSLER, I. & RACKE, K., Endogenous nitric oxide inhibits leukotriene B4 release from rat alveolar macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, **326**:53-60.
- CAIVANO, M., Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. *FEBS Letters* 1998, **429**:249-253.
- CAMHI, S.L., ALAM, J., WIEGAND, G.W., CHIN, B.Y. & CHOI, A.M., Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1998, **18**:226-234.
- CERQUETTI, M.C., GOREN, N.B., ROPOLO, A.J., GRASSO, D., GIACOMODONATO, M.N. & VACCARO, M.I., Nitric Oxide and Apoptosis Induced in Peyer's Patches by Attenuated Strains of Salmonella enterica Serovar Enteritidis. *Infect. Immun.* 2002, **70**:964-969.
- CHANG, C.I., LIAO, J.C. & KUO, L., Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am. J. Physiol.* 1998, **274**:H342-H348.
- CHARTRAIN, N.A., GELLER, D.A., KOTY, P.P., SITRIN, N.F., NUSSLER, A.K., HOFFMAN, E.P., BILLIAR, T.R., HUTCHINSON, N.I. & MUDGETT, J.S., Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**:6765-6772.
- CLOSS, E.I., ALBRITTON, L.M., KIM, J.W. & CUNNINGHAM, J.M., Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**:7538-7544
- CLOSS, E.I., LYONS, C.R., KELLY, C. & CUNNINGHAM, J.M., Characterization of the Third Member of the MCAT Family of Cationic Amino Acid Transporters. *J. BIOL. CHEM.* 1993, **268**:20796-20800.
- CLOSS, E.I., CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporters *Amino Acids* 1996, **11**:193-208. Review.
- CLOSS, E.I., GRAF, P., HABERMEIER, A., CUNNINGHAM, J.M. & FORSTERMANN, U., Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 1997, **36**:6462-6468.
- CLOSS, E.I., SCHELD, J-S., SHARAFI, M. & FÖRSTERMANN, U., Substrate Supply for Nitric-Oxide Synthase in Macrophages and Endothelial Cells: Role of Cationic Amino Acid Transporters. *Mol. Pharmacol.* 2000, **57**:68-74.
- CLOSS, E.I., Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr. Opin. Nephrol. H.* 2002, **11**:99-107.
- DARVILLE, M.I., TERRY, S. & EIZIRIK, D.L., An Octamer Motif Is Required for Activation of the Inducible Nitric Oxide Synthase Promoter in Pancreatic β -Cells. *Endocrinology* 2004, **145**:1130-1136.

- DENLINGER, L.C., FISETTE, P.L., GARIS, K.A., KWON, G., VAZQUEZ-TORRES, A., SIMON, A.D., NGUYEN, B., PROCTOR, R.A., BERTICS, P.J. & CORBETT, J.A., Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Macrophage Purinoreceptors and Calcium. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**:337–342.
- DEL ZOPPO, G., GINIS, I., HALLENBECK, J.M., IADECOLA, C., WANG, X. & FEUERSTEIN, G.Z., Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 2000, **10**:95-112.
- DEVÉS, R. & BOYD, C.A.R., Transporters for Cationic Amino Acids in Animal Cells: Discovery, Structure, and Function. *Physiol. Rev.* 1998, **78**:487-545.
- DUGAS, N., PALACIOS-CALENDER, M., DUGAS, B., RIVEROS-MORENO, V., DELFRAISSY, J.F., KOLB, J.P. & MONCADA, S., Regulation by endogenous INTERLEUKIN-10 of the expression of nitric oxide synthase induced after ligation of CD23 in human macrophages. *Cytokine* 1998, **10**:680-689.
- ESKANDARI, M.K., KALFF, J.C., BILLIAR, T.R., LEE, K.K.W. & BAUER, A.J., LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am. J. Physiol.* 1999, **277**:G478–G486.
- FINLEY, K.D., KAKUDA, D.K., BARRIEUX, A., KLEEMAN, J., HUYNH, P.D. & MACLEOD, C.L., A Mammalian arginine/Lysine transporter uses multiple Promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, **92**:9378-9382.
- FÖRSTERMANN, U. & KLEINERT, H., Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1995, **352**:351-364.
- FÖRSTERMANN, U., BOISSEL, J.P. & KLEINERT, H., Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 1998, **12**:773-790.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, **288**:373-376.
- GAO, J., MORRISON, D.C., PARMELY, T.J., RUSSELL, S.W. & MURPHY, W.J., An Interferon-g-activated Site (GAS) Is Necessary for Full Expression of the Mouse iNOS Gene in Response to Interferon-g and Lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**:1226–1230.
- GOLDRING, C.E.P., NARAYANAN, R., LAGADEC, P. & JEANNIN, J.F., Transcriptional inhibition of the inducible nitric oxide synthase gene by competitive binding of NF-kappa B/Rel proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, **209**:73-79.

- GOLDRING, C.E.P., REVENEAU, S., ALGARTÉ, M. & JEANNIN, J.-F., In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6 *Nucleic Acids Res.* 1996, **24**:1628-1637.
- GRISCAVAGE, J.M., ROGERS, N.E., SHERMAN, M.P., IGNARRO, L.J., Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* 1993, **151**:6329-6337.
- GUHA, M. & MACKMAN, N., LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001, **13**:85-94. Review.
- GUHA, M. & MACKMAN, N., The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**:32124-32132.
- GUO, R.F., LENTSCH, A.B., SARMA, J.V., SUN, L., RIEDEMANN, N.C., MCCLINTOCK, S.D., MCGUIRE, S.R., VAN ROOIJEN, N. & WARD, P.A., Activator protein-1 activation in acute lung injury. *Am. J. Pathol.* 2002, **161**:275-282.
- HABERMEIER A, WOLF S, MARTINE U, GRAF P, CLOSS EI., Two amino acid residues determine the low substrate affinity of the human cationic amino acid transporter-2A (hCAT-2A). *J. Biol. Chem.* 2003, **278**:19492-19499.
- HAMMERMANN, R., BLIESENER, N., MÖSSNER, J., KLASSEN, S., WIESINGER, H., WESSLER, I. & RACKÉ, K., Inability of rat alveolar macrophages to recycle L-citrulline to L-arginine despite induction of argininosuccinate synthetase mRNA and protein, and inhibition of nitric oxide synthesis by exogenous L-citrulline. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998, **358**:601-607.
- HAMMERMANN, R., DREISSIG, M.D., MÖSSNER, J., FUHRMANN, M., BERRINO, L., GÖTHERT, M. & RACKÉ, K., Nuclear factor-kappa B mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and Up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol. Pharmacol.* 2000, **58**:1294-1302.
- HELDWEIN, K.A., GOLENBOCK, D.T. & FENTON, M.J., Recent Advances in the Biology of Toll-like Receptors. *Mod. Asp. Immunobiol.* 2001, **1**:249-252.
- HEY, C., WESSLER, I. & RACKÉ, K., Nitric oxide synthase activity is inducible in rat, but not rabbit alveolar macrophages, with a concomitant reduction in arginase activity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1995, **351**:651-659.
- HEY, C., BOUCHER, J.-L., VADON-LE GOFF, S., KETTERER, G., WESSLER, I. & KURT RACKÉ, Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by No-hydroxy-D,L- indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 1997, **121**:395-400.
- HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K. & AKIRA, S., Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to

- lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 1999, **162**:3749-3752.
- HOSOKAWA, H., SAWAMURA, T., KOBAYASHI, S., NINOMIYA, H., MIWA, S. & SAKI, T.M., Cloning and Characterization of a Brain-specific Cationic Amino Acid Transporter. *J. Biol.Chem.* 1997, **272**:8717–8722.
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, **84**:9265-9269
- INTRONA, M., HAMILTON, T.A., KAUFMAN, R.E., ADAMS, D.O. & BAST, R.C. JR., Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alters expression of c-fos and c-myc oncogenes. *J. Immunol.* 1986, **137**:2711-2715.
- JACOBS, M.D. & HARRISON, S.C., Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell* 1998, **95**:749–758.
- JACOBS, A.T. & IGNARRO, L.J., Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**:47950-47957.
- JACOBS, A.T. & IGNARRO, L.J., Nuclear Factor-kappa B and Mitogen-activated Protein Kinases Mediate Nitric Oxide-enhanced Transcriptional Expression of Interferon-beta. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**:8018-8027.
- JAIN, B., RUBINSTEIN, I., ROBBINS, R.A., LEISE, KL, SISSON JH., Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, **191**:83-88.
- JAISWAL, M., LARUSSO, N.F. & GORES, G.J., Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, **281**:G626–G634.
- JEON, Y.J., HAN, S.H., LEE, Y.W., LEE, M., YANG, K.H., KIM, H.M., Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology* 2000, **48**:173-183.
- KAKUDA, D.K., SWEET, M.J., MACLEOD, C.L., HUME, D.A. & MARKOVICH, D., CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem. J.* 1999, **340**:549-553.
- KAMINSKA, B., KACZMAREK, L., MALAGUARNERA, L., ARCIDIACONO, A., MESINA, L., SPAMPINATO, G., MESSINA, A., Transcription factor activation and functional stimulation of human monocytes. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1992, **16**:37-45.
- KAVANAUGH MP., Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry.* 1993, **32**:5781-5785.
- KAWAI, T., TAKEUCHI, O., FUJITA, T., INOUE, J., MUHLRADT, P.F., SATO, S., HOSHINO, K.

- & AKIRA, S., Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes. *J. Immunol.* 2001, **167**:5887–5894.
- KEINANEN, R., VARTIAINEN, N., KOISTINAHO, J., Molecular cloning and characterization of the rat inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Gene* 1999, **234**:297-305.
- KENYON, N.J., VAN DER VLIET, A., SCHOCK, B.C., OKAMOTO, T., MCGREW, G.M. & LAST, J.A., Susceptibility to ozone-induced acute lung injury in iNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2002, **282**:L540–L545.
- KIM, J.W., CLOSS, E.I., ALBRITTON, L.M. & CUNNINGHAM, J.M., Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 1991, **352**:725-728.
- KIM, Y.M., LEE, B.S., YI, K.Y. & PAIK, S.G., Upstream NF-kappa B site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon- γ plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, **236**:655-660.
- KIM, P.K., ZAMORA, R., PETROSKO, P., BILLIAR, T.R., The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int. Immunopharmacol.* 2001, **8**:1421-1441.
- KIZAKI, T., SUZUKI, K., HITOMI, Y., IWABUCHI, K., ONOE, K., HAGA, S., ISHIDA, H., OOKAWARA, T., SUZUKI, K. & OHNO, H., Negative regulation of LPS-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by AP-1 in macrophage cell line J774A.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, **289**:1031-1038.
- KLASEN, S., HAMMERMANN, R., FUHRMANN, M., LINDEMANN, D., BECK, K.F., PFEILSCHIFTER, J. & RACKE, K., Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 2001, **132**:1349-1357.
- KORHONEN, R., KANKAANRANTA, H., LAHTI, H., LA HDE, M., RICHARD G. KNOWLES & MOILANEN, E., Bi-directional effects of the elevation of intracellular calcium on the expression of inducible nitric oxide synthase in J774 macrophages exposed to low and to high concentrations of endotoxin. *Biochem. J.* 2001, **354**:351-358.
- KREBS, H.A. & HENSELEIT, K., Urea formation in the animal body. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1932, **210**:33–66.
- KURZ, S. & HARRISON, D.G., Insulin and the arginine paradox. *J. Clin. Invest.* 1997, **99**:369-370.
- LAMAS, S., MARSDEN, P.A., LI, G.K., TEMPST, PAUL & MICHEL, T., Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**:6348-6352.
- LEE, J.D., KRAVCHENKO, V., KIRKLAND, T.N., HAN, J., MACKMAN, N., MORIARTY, A.,

- LETURCQ, D., TOBIAS, P.S. & ULEVITCH, R.J., Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**:9930-9934.
- LI, Y.-H., YAN, Z.-Q., BRAUNER, A. & TULLUS, K., Activation of macrophage nuclear factor- κ B and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS. *Respir. Res.* 2002, **3**:23.
- LIEW, F.Y., WEI, X.-Q. & PROUDFOOT, L., Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1997, **352**:1311-1315.
- LIN, Y.-L. & LIN, J.-K., (2)-Epigallocatechin-3-gallate Blocks the Induction of Nitric Oxide Synthase by Down-Regulating Lipopolysaccharide-Induced Activity of Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. *Mol. Pharmacol.* 1997, **52**:465-472.
- LIU, Q.P., FRUIT, K., WARD, J. & CORRELL, P.H., Negative regulation of macrophage activation in response to IFN- γ and lipopolysaccharide by the STK/RON receptor tyrosine kinase. *J. Immunol.* 1999, **163**:6606-6613.
- LOUIS, C.A., REICHNER, J.S., HENRY, W.L. JR, MASTROFRANCESCO, B., GOTOH, T., MORI, M. & ALBINA, J.E., Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. *Am. J. Physiol.* 1998, **274**:R775-R782.
- LOWENSTEIN, C.J., ALLEY, E.W., RAVAL, P., SNOWMAN, A.M., SNYDER, S.H., RUSSELL, S.W. & MURPHY, W.J., Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**:9730-9734.
- MACLEOD, C. L. & KAKUDA, D.K., Regulation of CAT: Cationic Amino Acid Transporter gene expression. *Amino Acids* 1996, **11**:171-191, Review.
- MARKS-KONCZALIK, J., CHU, S.C. & MOSS, J., Cytokine-mediated Transcriptional Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Requires Both Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B-binding Sites. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**:22201-22208.
- MCDONALD, K.K., ZHARIKOV, S., BLOCK, E.R. & KILBERG, M.S., A Caveolar Complex between the Cationic Amino Acid Transporter 1 and Endothelial Nitric-oxide Synthase May Explain the "Arginine Paradox". *J. Biol. Chem.* 1997, **50**:31213-31216.
- MESSERI DREIßIG, M.D., HAMMERMANN, R., MÖSSNER, J., GÖTHERT, M. & RACKÉ, K., In rat alveolar macrophages lipopolysaccharides exert divergent effects on the transport of the cationic amino acids L-arginine and L-ornithine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000, **361**:621-628.
- MEURS, H., MCKAY, S., MAARSINGH, H., HAMER, M.A., MACIC, L., MOLENDIJK, N. & ZAAGSMA, J., Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *Br. J. Pharmacol.* 2002,

- 136**:391-398.
- MIYASAKA, N. & HIRATA, Y., Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* 1997, **61**:2073-2081.
- MÖSSNER, 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.
- MOORE, K.W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L. & O'GARRA, A., INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, **19**:683-765.
- MORRIS, S.M., JR., KEPKA-LENHART, D. & CHEN, L.C., Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am. J. Physiol.* 1998, **275**:E740-E747.
- MUNDER, M., EICHMANN, K. & MODOLELL, M., Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD41 T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. *J. Immunol.* 1998, **160**:5347-5354.
- NAWRATH, H., WEGENER, J.W., RUPP, J., HABERMEIER, A. & CLOSS, E.I., Voltage dependence of L-arginine transport by hCAT-2A and hCAT-2B expressed in oocytes from *Xenopus laevis*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000, **279**:C1336-C1344.
- NICHOLSON, B., MANNER, C.K., KLEEMAN, J. & MACLEOD C.L., Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**:15881-15885.
- OHTAKE, A., TAKIGUCHI, M., SHIGETO, Y., AMAYA, Y., KAWAMOTO, S. & MORI, M., Structural organization of the gene for rat liver-type arginase. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**:2245-2249.
- OSAWA, Y., LOWE, E.R., EVERETT, A.C., DUNBAR, A.Y. & BILLECKE, S.S., Proteolytic Degradation of Nitric Oxide Synthase: Effect of Inhibitors and Role of hsp90-Based Chaperones. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003, **304**:493-497. Review.
- OZES, O.N., MAYO, L.D., GUSTIN, J.A., PFEFFER, S.R., PFEFFER, L.M., DONNER, D.B., NF-kappa B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999, **401**:82-85.
- PEPPERL, S., DORGER, M., RINGEL, F., KUPATT, C. & KROMBACH, F., Hyperoxia upregulates the NO pathway in alveolar macrophages in vitro: role of AP-1 and NF-kappa B. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2001, **280**:L905-L913.
- PERRELLA, M.A., PELLACANI, A., WIESEL, P., CHIN, M.T., FOSTER, L.C., IBANEZ, M., HSIEH, C.M., REEVES, R., YET, S.F. & LEE, M.E., High Mobility Group-I(Y) Protein Facilitates Nuclear Factor-kB Binding and Transactivation of the Inducible Nitric-oxide

- Synthase Promoter/Enhancer. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**:9045–9052.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M.Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., CASTAGNOLI, P.R., LAYTON & B., BEUTLER, B.. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* 1998, **282**:2085-2088
- RICCIARDOLO, F.L., TIMMERS, M.C., GEPPETTI, P., VAN SCHADEWIJK, A., BRAHIM, J.J., SONT, J.K., DE GOUW, H.W., HIEMSTRA, P.S., VAN KRIEKEN, J.H. & STERK, P.J., Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, **108**:198-204.
- RICCIARDOLO, F.L.M., Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003, **58**:175–182.
- ROPERT, C., ALMEIDA, I.C., CLOSEL, M., TRAVASSOS, L.R., FERGUSON, M.A.J., COHEN, P. & GAZZINELLI, R.T., Requirement of Mitogen-Activated Protein Kinases and IκB Phosphorylation for Induction of Proinflammatory Cytokines Synthesis by Macrophages Indicates Functional Similarity of Receptors Triggered by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from Parasitic Protozoa and Bacterial Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 2001, **166**:3423–3431.
- RUETTEN, H. & THIEMERMANN, C., Interleukin-13 is a more potent inhibitor of the expression of inducible nitric oxide synthase in smooth muscle cells than in macrophages: a comparison with interleukin-4 and interleukin-10. *Shock* 1997, **8**:409-414.
- 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, **277**:E110–E117.
- SAXENA, S.K., MATHUR, A. & SRIVASTAVA, R.C., Induction of nitric oxide synthase during Japanese encephalitis virus infection: evidence of protective role. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, **391**:1-7.
- SCHMIDT, H.H., NAU, H., WITTFOHT, W., GERLACH, J., PRESCHER, K.E., KLEIN, M.M., NIROOMAND, F. & BOHME, E., Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, **154**:213-216.
- SCHUILING, M., ZUIDHOF, A.B., BONOUVRIE, M.A., VENEMA, N., ZAAGSMA, J. & MEURS, H., Role of nitric oxide in the development and partial reversal of allergen-induced airway hyperreactivity in conscious, unrestrained guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 1998, **123**:1450-1456.
- SCHUMANN, R.R., LEONG, S.R., FLAGGS, G.W., GRAY, P.W., WRIGHT, S.D., MATHISON, J.C., TOBIAS, P.S. & ULEVITCH, R.J., Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990, **249**:1429-1431.
- SCOTT, D.J., HULL, M.A., CARTWRIGHT, E.J., LAM, W.K., TISBURY, A., POULSOM, R.,

- MARKHAM, A.F., BONIFER, C. & COLETTA, P.L., Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse. *Gastroenterology* 2001, **121**:889-899.
- SHI, O., KEPKA-LENHART, D., MORRIS, S.M. JR. & O'BRIEN, W.E., Structure of the murine arginase II gene. *Mamm. Genome* 1998, **9**:822-824.
- SILKOFF, P.E., SYLVESTER, J.T., ZAMEL, N. & PERMUTT, S., Airway Nitric Oxide Diffusion in Asthma Role in Pulmonary Function and Bronchial Responsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, **161**:1218-1228.
- SPERANDEO, M.P., BORSANI, G., INCERTI, B., ZOLLO, M., ROSSI, E., ZUFFARDI, O., CASTALDO, P., TAGLIALATELA, M., ANDRIA, G. & SEBASTIO, G., The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiocardial syndrome. *Genomics* 1998, **49**:230-236.
- SRIVASTAVA, K.D., ROM, W.N., JAGIRDAR, J., YIE, T-A., GORDON, T. & TCHOU-WONG, K.M., Crucial Role of Interleukin-1 β and Nitric Oxide Synthase in Silica-induced Inflammation and Apoptosis in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, **165**:527-533.
- STARK, M.E., BAUER, A.J., SARR, M.G. & SZURSZEWSKI, J.H., Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. *Gastroenterology* 1993, **104**:398-409.
- STEVENS, B.R., KAKUDA, D.K., YU, K., WATERS, M., VO, C.B. & RAIZADA, M.K., Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**:24017-24022.
- STEVENS-TRUSS, R. & MARLETTA, M.A., Interaction of calmodulin with the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1995, **34**:15638-15645.
- STOUT, R.D., SUTTLES, J., XU, J., GREWAL, I.S. & FLAVELL, R.A., Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol.* 1996, **156**:8-11.
- TAN, C., MUI, A. & DEDHAR, S., Integrin-linked Kinase Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Expression in an NF-kB-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**:I3109-I3116.
- TAO, X. & STOUT, R.D., T cell-mediated cognate signaling of nitric oxide production by macrophages. Requirements for macrophage activation by plasma membranes isolated from T cells. *Eur. J. Immunol.* 1993, **23**:916-921.
- TENGGU-MUHAMMAD, T.S., HUGHES, T.R., FOKA, P., CRYER, A. & RAMJI, D.P., Cytokine-mediated differential regulation of macrophage activator protein-1 genes. *Cytokine* 2000, **12**:720-726.
- TORIHASHI, S., OZAKI, H., HORI, M., KITA, M., OHOTA, S. & KARAKI, H., Resident macrophages activated by lipopolysaccharide suppress muscle tension and initiate

- inflammatory response in the gastrointestinal muscle layer. *Histochem. Cell. Biol.* 2000, **113**:73–80.
- TRIFILIEFF, A., FUJITANI, Y., MENTZ, F., DUGAS, B., FUENTES, M. & BERTRAND, C., Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors Suppress Airway Inflammation in Mice Through Down-Regulation of Chemokine Expression. *J. Immunol.* 2000, **165**:1526–1533.
- ULLRICH, R., BLOCH, K.D., ICHINOSE, F., STEUDEL, W. & ZAPOL, W.M., Hypoxic pulmonary blood flow redistribution and arterial oxygenation in endotoxin-challenged NOS2-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1999, **104**:1421-1429.
- WANG, H., KAVANAUGH, M.P., NORTH, R.A., KABAT, D., Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 1991, **352**:729-731.
- WARD, J.K., BELVISI, M.G., FOX, A.J., MIURA, M., TADJKARIMI, S., YACOUB, M.H. & BARNES, P.J., Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J. Clin. Invest.* 1993, **92**:736-742.
- WIESINGER, H., Arginine Metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2001, **64**:365-391.
- WRIGHT, S.D., RAMOS, R.A., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J., MATHISON, J.C., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990, **249**:1431-1433.
- WU, G.Y. & BROSINAN, J.T., Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem. J.* 1992, **281**:45-48.
- XIE, Q.-W., CHO, H.J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R.A., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., DING, A., TROSO, T. & NATHAN, C., Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992, **256**:225-228.
- XIE, Q.-W., KASHIWABARA, Y. & NATHAN, C., Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**:4705-4708.
- XIE, Q.-W., A Novel Lipopolysaccharide-response Element Contributes to Induction of Nitric Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**:14867-14872.
- XU, W., LIU, L.Z., LOIZIDOU, M., AHMED, M. & CHARLES, I.G., The role of nitric oxide in cancer. *Cell. Res.* 2002, **12**:311-320.
- YE, X. & LIU, S.F., Lipopolysaccharide regulates constitutive and inducible transcription factor activities differentially in vivo in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, **288**:927-932.
- YUAN, T., VOGEL, H.J., SUTHERLAND, C. & WALSH, M.P., Characterization of the Ca²⁺-dependent and -independent interactions between calmodulin and its binding domain of inducible nitric oxide synthase. *FEBS Letters* 1998, **431**:210-214.

7.0. Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Manfred Göthert danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn eine Dissertation anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Racké für die Überlassung des Themas der Arbeit sowie die intensive Betreuung. Diese erstreckte sich von der Planung der Versuche und deren Durchführung bis hin zu vielzähligen Anregungen und stets freundlicher Diskussionsbereitschaft während der Erstellung der Dissertationsschrift.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Gernot Brunn, Margarita Fuhrmann, Rainer Hammermann, Dirk Lindemann, Sonja Matthiesen und Christina Stichnote für die freundliche Aufnahme, stete Hilfsbereitschaft und viele fröhliche Momente.

Von ganzem Herzen danke ich den Mitgliedern meiner Familie, die mir als Vorbilder in meinem Leben dienten und deren Unterstützung mir die Inangriffnahme dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Bonn, den **30.07.2007**