

**Rolle der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen bei
der Regulation der L-Arginin-abhängigen
Stoffwechselwege in Alveolarmakrophagen**

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

Nathalie Domanoldou

aus Köln

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Kurt Racké
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Stüber

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.02.2009

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

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

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungen	7
A.	Einleitung	9
I.	Testsubstanzen: Okadeinsäure und bakterielle Lipopolysaccharide	10
II.	L-Arginin als gemeinsames Substrat verschiedener Enzymfamilien	11
II.	Arginin-Transport	12
III.	Die Arginasen	13
IV.	Die NO-Synthasen	16
V.	NO	20
B.	Zielsetzung	26
C.	Material und Methoden	27
I.	Material	27
I.1.	Chemikalien und Enzyme	27
I.2.	Lösungen und Puffer	29
I.3.	Antikörper und Primer	42
I.4.	Arbeitsgeräte	43
II.	Methoden	44
II.1.	Isolierung und Kultivierung von Makrophagen aus der Rattenlunge	44
II.2.	Spektralfotometrische Bestimmung von Nitrit	46
II.3.	Arginase-Assay	46
II.4.	Proteinbestimmung mit dem DC Protein-Assay	48
II.5.	MTT-Vitalitätsassay	48
II.6.	RNA-Präparation aus Alveolarmakrophagen der Ratte	49
II.7.	Reverse Transkription	50
II.8.	Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese	51

II.9.	Proteinpräparation aus Alveolarmakrophagen für einen anschließenden Western-Blot	53
I.10.	Statistik und Berechnung	57
D.	Ergebnisse	58
I.	Aktivität der iNOS und der Arginasen unter der Wirkung von LPS für 20 h	58
I.1.	Quantifizierung der iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von LPS für 20 h	58
I.2.	Quantifizierung der Arginasen-Aktivität unter dem Einfluss von LPS für 20 h	59
II.	Aktivität der iNOS, Arginase I und II unter der Wirkung von LPS für 1 h	60
II.1.	Quantifizierung der Arginasen-Aktivität unter dem Einfluss von LPS für 1 h	60
II.2.	iNOS-Aktivität unter einstündiger LPS-Wirkung	60
III.	Aktivität der iNOS und der Arginasen unter der Wirkung von OA für 20 h	61
III.1.	Quantifizierung der iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von OA für 20 h	62
III.2.	Quantifizierung der Arginasen-Aktivität unter dem Einfluss von OA für 20 h	62
IV.	Aktivität der iNOS und der Arginasen unter der Wirkung von OA für 1 h	64
V.	Proteinbestimmung und Vitalitätsassay	65
VI.	Einfluss von LPS auf die Expression von iNOS, Arginase I und II	68
VI.1.	mRNA-Expression von iNOS unter der Wirkung von LPS	68
VI.2.	mRNA-Expression von Arginase I und II unter der Wirkung von LPS	69

VII.	Expressionsmuster der Phosphatasen 1α, 1β, 1γ und PP2	70
VII.1.	Expressionsmuster der PP 1 α , 1 β , 1 γ und PP 2 unter Kontrollbedingungen	71
VII.2.	Expressionsmuster der PP 1 α , 1 β , 1 γ und PP 2 unter LPS	71
VIII.	Einfluss von OA auf die Expression von iNOS, Arginase I und II	72
VIII.1.	mRNA-Expression von iNOS unter der Wirkung von OA	72
VIII.2.	mRNA-Expression von Arginase I und II unter der Wirkung von OA	73
IX.	Einfluss von OA auf die Proteinexpression von iNOS und Arginase I	76
IX.1.	Proteinexpression der iNOS unter der Wirkung von OA	76
IX.2.	Proteinexpression der Arginase I unter der Wirkung von OA	77
E.	Diskussion	79
I.	Enzymatische Aktivität, Induzierbarkeit und Expressionsmuster von iNOS, Arginase I und II unter LPS	79
II.	Enzymatische Aktivität, Induzierbarkeit und Expressionsmuster von iNOS, Arginase I und II unter OA	85
III.	Proteinexpression von iNOS und Arginase I	87
IV.	Auswirkungen von OA auf die Zellintegrität	89
V.	Serin/Threonin-Proteinphosphatasen	89
VI.	Die Kettenreaktion der Zellaktivierung	91
VII.	Pathophysiologische Konsequenzen der Phosphatasen für die iNOS-, Arginase I- und II-Funktion	92

F.	Zusammenfassung	95
G.	Literatur	97
	Lebenslauf	105
	Danksagung	106

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Acces.	Accession
Anti-	-antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	kationischer Aminosäuretransporter
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase, umfaßt eNOS und nNOS
CO₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDGF	endothelium derived growth factor
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	entspricht NOS III, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunde
IC₅₀	inhibitorische Konzentration zur Erwirkung einer 50% Hemmung, Maß für Bindungsaffinität des Inhibitors
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	spezieller Inhibitor von NF-κB
IL	Interleukin
iNOS	entspricht NOS II, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kD	Kilodalton
K_m	Michaeliskonstante
Kt	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharid

Mio	Million
mRNA	Botschafter-Ribonukleinsäure
NANC	nicht-adrenerg nicht-cholinerg
NF-κB	nukleärer Faktor Kappa B
nNOS	entspricht NOS I, neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS I	entspricht nNOS, neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS II	entspricht iNOS, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS III	entspricht eNOS, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
OA	Okadeinsäure
OD	optische Dichte
P	Signifikanzniveau
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PI	Proteinaseinhibitoren
PP	Proteinphosphatase
q. s.	<i>quantum santis</i> (Lat.): die Menge, die notwendig ist (um...)
r	Ratten-
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse-Transkriptase-Reaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TGF-β	Transforming Growth Factor beta-1
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U	Einheiten/Units
VIP	Vaso/Intestinales Polypeptid
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vs.	versus

A. EINLEITUNG

Die Kontrolle der Zelldifferenzierung und des daraus resultierenden zellspezifischen Stoffwechsels ist eine Grundvoraussetzung für die physiologische Entwicklung und Funktion von Eukaryonten. Intrazelluläre Signaltransduktionswege spielen dabei eine erhebliche Rolle, indem sie eine Vielzahl zellulärer Prozesse initiieren und aufrechterhalten wie z.B. die Genexpression, Zellzyklusabfolge und die Apoptose. Die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung der daran beteiligten Komponenten ist ein wesentlicher regulatorischer Mechanismus zur Kontrolle solcher zellulären Vorgänge (Waddington et al., 1998).

Der Phosphorylierungszustand eines Proteins stellt einen dynamischen Prozess dar, welcher durch Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen aufrechterhalten wird. Kennzeichen der stoffwechselkontrollierenden Signaltransduktionswege ist ihre Fähigkeit, auf exogene Reize adäquat intrazellulär zu reagieren. So bewirken verschiedene extrazelluläre Moleküle wie Hormone, Toxine, Entzündungsmediatoren oder Wachstumsfaktoren eine vorläufige Änderung des intrazellulären Stoffwechsels und haben dadurch Kontrolleigenschaften im weiteren Sinne. Die genetische Antwort der Zellen auf diese Moleküle erfordert in der Regel Signalrezeptoren, eine anschließende Signaltransduktion mit sog. second und third messengers und die Änderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, welche Zielgene aktivieren oder supprimieren. Werden solche Zielgene inadäquat exprimiert, entweder quantitativ beispielsweise im Überschuss oder qualitativ wie im Falle einer Mutation, so können ihre Genprodukte der Zelle selbst und auch der Umgebung großen Schaden anrichten (Cai et al., 1990). Viele extrazelluläre Botenmoleküle besitzen Kinasenfunktion. Nach Bindung an die entsprechenden Liganden wird ihre enzymatische Aktivität in Gang gesetzt und Kinasekaskaden initiiert mit Weitervermittlung des kaskadenspezifischen Signals an den Nukleus. Im Kern werden dann genaue Ziele, z.B. die bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren, phosphoryliert und gezielte Änderungen in der Aktivität der Genexpression verursacht. Anhand des veränderten Genexpressionsmusters wird die entsprechende phänotypische Antwort der Zelle mit veränderter Stoffwechsellage herbeigeführt (Hunter, 1995). Zweifellos ist die enzymatische Aktivität von intra- und

extrazellulären Kinasen und ihren Gegenspielern, den Phosphatasen, eine absolute Grundvoraussetzung für die physiologische Funktion von Zellen im Einzelnen und von Zellgefügen. Die Regulation dieser Metabolisierungswege setzt unabdingbar eine präzise Koordination voraus.

Während der Beitrag der Kinasen zu der Regulation von Signalkaskaden in der Wissenschaft etabliert ist, ist der heutige Wissensstand über die Beteiligung der Phosphatasen an diesen Vorgängen noch dürftig und hat erst kürzlich mehr Aufmerksamkeit unter den Forschern erlangt. Die Verfügbarkeit verschiedener in der Natur vorkommender Phosphatase-Inhibitoren verhalf zu mehr Einsicht in ihre Funktion bei unterschiedlichen Signalkaskaden.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Bedeutung dieser ubiquitären, phosphatabspaltenden Enzyme bei der Regulation des Arginin-Stoffwechsels in Alveolarmakrophagen der Ratte im Allgemeinen und unter dem Einfluss externer Stimuli. Zu diesem Zweck wurden Testsubstanzen verwendet, um die entsprechenden extra- bzw. intrazellulären Verhältnisse zu simulieren. Als Schwerpunkt unserer Betrachtungen galten dabei die Reaktionen der NO-Synthasen und der Arginasen, da beide Enzymreaktionen in früheren Untersuchungen eine wechselseitige Beeinflussung aufwiesen und eine Konkurrenzsituation für das gemeinsame Substrat L-Arginin erzeugten (Hey et al., 1997). Beide Mediatorwege sind für das Überleben höherer Organismen unerlässlich und werden unter Umständen mit pathophysiologischen Prozessen speziell in den Atemwegen in Verbindung gebracht (Thomassen & Kavuru, 2001). Im Folgenden wird auf einige Grundzüge und Zusammenhänge des Argininstoffwechsels eingegangen sowie auf die Wirkweise der von uns angewandten Versuchssagenzien, die das Verständnis bzgl. ihrer Bedeutung erleichtern.

I. Testsubstanzen: Okadeinsäure und bakterielle Lipopolysaccharide

Das von Meeresflagellaten produzierte Fettsäure-Derivat Okadeinsäure ist aufgrund seiner Polyetherstruktur zellpermeabel, seine Akkumulation geschieht jedoch allmählich in einem langsamen Prozess (Wera & Hemmings, 1995). Die einzigen zellulären Ziele der Okadeinsäure, welche bis zum heutigen Zeitpunkt identifiziert

wurden, sind bestimmte Mitglieder der Familie der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen. Als potenter Inhibitor der zwei wesentlichen intrazellulären Phosphatasen, PP 1 mit ihren Isoenzymen 1α , 1β und 1γ und PP 2, bindet sie an ihre katalytischen Untereinheiten und hemmt ihre enzymatische Aktivität, wobei die Hemmung von PP 2 mit einem IC_{50} von 0,2 nM effizienter ist als die von PP 1 mit einem IC_{50} von 20 nM (Schönthal, 1998). Zur Zeit sind fünf Okadeinsäureempfindliche Phosphatasen identifiziert worden, von denen noch weitere Untergruppen existieren. Die starke zelluläre Präsenz und ihr ubiquitäres Vorkommen lenken aber die Aufmerksamkeit der Untersuchungen im Allgemeinen auf die Phosphatasen 1 und 2 (Schönthal, 1998).

Lipopolysaccharide sind ein Hauptbestandteil der zellulären Wand der meisten gramnegativen Bakterien. Aufgrund ihrer hohen immunogenen Eigenschaften und der Fähigkeit Immunantworten des Wirtes, verursacht durch lösliche Antigene, eindrücklich zu potenzieren, werden sie extensiv in der experimentellen Immunologie verwendet. Basierend auf dem reproduzierbaren Vergleichsstandard vielzähliger Labore (Klasen et al., 2001; Sonoki et al., 1997), diente in unserer Versuchsreihe der Zusatz von LPS als Positivkontrolle für unsere Kontrolle.

II. L-Arginin als gemeinsames Substrat verschiedener Enzymfamilien

Die basische Aminosäure L-Arginin dient als Vorläufer für Kreatin, welches eine essentielle Rolle bei dem Energiemetabolismus des Muskels, der Nerven und der Hoden spielt und bei der Synthese von Arginin und Proteinen mitwirkt (Tapiero et al., 2002). Aufgrund seiner Fähigkeit die Sekretion von Wachstumshormon zu erhöhen, beeinflusst es das Immunsystem (Lewis & Langkamp-Henken, 2000). Die wesentliche Funktion von L-Arginin wird jedoch seiner maßgebenden Rolle als Vorläufermolekül für die Synthese von NO zugeschrieben.

Isoliert wurde L-Arginin erstmals 1886 aus Wolfskraut (Schulze & Steiger, 1886), um bald darauf als Bestandteil tierischer Proteine identifiziert zu werden (Heldin, 1895). In den späten 30er Jahren war es das Verdienst von Krebs und Kollegen durch die Entdeckung des Harnstoffzyklus, dass eine neue Ära in der L-Argininforschung begann. In den darauffolgenden Dekaden kristallisierte sich heraus, dass L-Arginin

nur bedingt eine essentielle Aminosäure für erwachsene Menschen und Tiere darstellte (Barbul et al., 1986). In der Zwischenzeit waren andere wissenschaftliche Arbeitsgruppen darum bemüht, den 1980 von Furchgott und Kollegen beschriebenen „endothelium derived growth factor“, EDGF, als NO zu identifizieren, was 1987 den Arbeitsgruppen Ignarro und Moncada erstmalig gelang (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Furchgott & Zawadzki, 1980). Als dann ein Jahr später L-Arginin als Edukt für das biologisch aktive Intermediärprodukt NO in aktivierten Makrophagen durch die Arbeitsgruppe Hibbs et al. erkannt wurde (Hibbs et al., 1988), gewannen die L-Arginin-abhängigen Stoffwechselwege zunehmend Beachtung durch die Forscher.

In Säugetierzellen dient L-Arginin als Substrat der NO-Synthasen, der Arginase-Isoenzyme, der Arginin-Glycin-Transaminase, der Kytorphin-Synthase und der Arginin-Decarboxylase (Bellinghieri et al., 2006). Unter diesen Enzymen werden die NO-Synthasen und die Arginase zu einem erheblichen Teil für den Arginin-Metabolismus in zytotoxischen Makrophagen verantwortlich gemacht (Cook et al., 1994; Granger et al., 1990). Über verschiedene Metabolisierungsschritte ist Arginin maßgeblich an der Synthese einer Reihe von Strukturproteinen beteiligt inklusive Kollagen (Janne et al., 1991). Aufgrund der multiplen Verstoffwechslungsmöglichkeiten von L-Arginin entstehen innerhalb der Zelle komplexe Enzyminteraktionen, bei welchen das Produkt eines Enzyms die Aktivität eines anderen Enzyms inhibieren kann (Mössner et al., 2001; Hrabák et al., 1996).

Die aktuelle intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin für die Arginin-katabolisierenden Enzyme wird von fünf Faktoren bestimmt: erstens von der exogenen Zufuhr durch die Nahrung in vivo bzw. durch das Medium bei Kulturzellen, zweitens durch Proteindegradierung, drittens durch endogene de-novo-Synthese, viertens durch den aktuellen Arginin-Katabolismus und fünftens durch den Arginin-Transport (Morris, 2000).

II. Arginin-Transport

Bei der Mehrzahl der Säugetierzellen wird dem Argininbedarf primär durch die Aufnahme von extrazellulärem Arginin über spezifische Transporter Genüge getan

(Van Winkle, 1993). Nicht alle Transporter liegen in jedem Zelltyp vor, und ihre Aktivitäten können als Antwort auf spezifische Stimuli wie z.B. bakterielle Endotoxine oder inflammatorische Zytokine dynamisch reguliert werden (MacLeod et al., 1996). Der wichtigste Mechanismus für die Argininaufnahme umfasst die transmembranären Proteine CAT-1 und CAT-2B, welche Transporteigenschaften für kationische Aminosäuren besitzen (Malandro & Kilberg, 1996). Da dieses Transportsystem eine wesentliche Rolle bei der Argininaufnahme spielt, ist die Regulation sowohl seiner Expression als auch seiner Aktivität wesentlicher Bestandteil der Forschung, weil es eine Schlüsselstelle bei der Modulation bzw. Manipulation des L-Arginin-Schicksals darstellt. An dieser Stelle sei angemerkt, dass diese Transporter durch andere kationische Aminosäuren und positive geladene Analoga mitunter kompetitiv inhibiert werden können. Auch werden sie wiederum zusammen mit der induzierbaren NO-Synthase durch dieselben Stimulantien koinduziert, was eine unterstützende Funktion vonseiten des Arginintransports auf die aktuell gesteigerte NO-Synthese impliziert (Hammermann et al., 2000; Wu & Morris, 1998; Wang et al., 1995).

III. Die Arginasen

Das Interesse für die Enzym-Familie der Arginasen (vereinfachend wird im Folgenden häufig von der Arginase in der Singular-Form gesprochen) ist aufgrund ihres regulatorischen Potentials in Bezug auf die Verfügbarkeit von Arginin für die Biosynthese von NO, Polyaminen und Prolin gewachsen. Über diese Stoffwechselwege sind die Arginasen u. a. in die Abwehrmechanismen des Organismus durch unspezifische Immunzellen eingebunden.

Obwohl Arginasen-Aktivität bereits 1904 in der Leber detektiert wurde (Kossel & Dakin, 1904), war es die Entdeckung des Harnstoffzyklus 1932 durch Krebs und Henseleit (Krebs & Henseleit, 1932), die der Wissenschaft ein neues Forschungsgebiet eröffnete. Vor dreißig Jahren erkannte man allmählich, dass zwei Arginasen-Isoenzyme existierten (Glass & Knox, 1973), was in den Folgejahren u.a. durch Grody und seine Mitarbeiter bestätigt wurde (Grody et al., 1989).

Die zwei Arginasen-Isoenzyme werden von zwei separaten Genen codiert. Sie sind sich bzgl. ihrer enzymatischen Eigenschaften und ihres Bedarfs an Mangan ähnlich,

unterscheiden sich jedoch in Hinsicht auf ihre subzelluläre Lokalisation, Verteilung im Gewebe, Regulation ihrer Expression und immunologischer Reaktivität (Morris, 1999; Jenkinson et al, 1996). Typ I Arginase ist ein zytosolisches Enzym und wird in hohem Maße in der Leber und in geringerem Umfang in einigen extrahepatischen Geweben exprimiert. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Arginase II um ein mitochondriales Enzym, welches in geringeren Mengen in Niere, Gehirn, Dünndarm, Brustdrüse und Makrophagen exprimiert wird (Grody et al., 1987). Viele unabhängige Arbeiten haben gezeigt, dass die Expression der Arginasen durch verschiedene Zytokine und andere Stimuli in verschiedenen Zelltypen, v.a. Makrophagen, stark induziert werden kann (Louis et al., 1999; Corraliza et al., 1995). Zu den stimulierenden Substanzen gehören u.a. die (anti-)inflammatorischen Moleküle IL-4, IL-10, cAMP und PGE₂ (Boutard et al., 1995; Corraliza et al., 1995; Hey et al., 1995). Obwohl zunächst vermutet wurde, dass Ratten-Makrophagen grundsätzlich nur das I-er Isoenzym exprimieren (Sonoki et al., 1997), haben spätere Arbeiten die Existenz beider Isoenzyme belegt, wobei den Ergebnissen zufolge Arginase I in viel stärkerem Ausmaß als Arginase II repräsentiert ist (Klasen et al., 2001; Waddington et al., 1998), obwohl auch gegensätzliche Berichte vorliegen (Carraway et al., 1998; Que et al., 1998), was auf die unterschiedliche Organherkunft der Makrophagen zurückgeführt wird. Zwischen der humanen Arginase II und dem entsprechenden Enzym der Ratte besteht ferner eine 88%ige Homologie (Iyer et al., 1998).

Umsatzeigenschaften

Der K_m -Wert der Arginasen von Säugetierzellen für L-Arginin liegt organabhängig zwischen 2 bis 20 mM (Grody et al., 1987), derjenige für die verschiedenen NOS-Enzyme beträgt jedoch 2 bis 20 μ M (Griffith & Stuehr, 1995). Andererseits ist die V_{max} der Arginase bei physiologischem pH tausendfach höher als die der NO-Synthasen, so dass effektiv ähnliche Substratumsatzraten für beide Enzyme resultieren (Wu & Morris, 1998). Genügend große Quantitäten an Arginase können aber somit die Verfügbarkeit von L-Arginin für die NO-Synthese in intakten Zellen limitieren. Dies kommt z.B. im Falle von Trauma zur Geltung, wobei der in der extrazellulären Wundflüssigkeit enthaltene L-Argininvorrat nahezu vollständig erschöpft wird. Ebenso verhält es sich auch in vitro im Nährmedium mit Argininzusatz für Makrophagenkulturen, welche eine Abwehrreaktion simulieren (Hecker et al., 1995; Albina et al., 1993).

Aus dem Aspekt der Entzündung, insbesondere vor dem Hintergrund der Asthmapathogenese, werden in der Wissenschaft zwei parallel existierende Situationen bzgl. der Arginasen-Rolle bei der Regulation der unspezifischen Immunantwort diskutiert und allgemein akzeptiert. Zum einen ist die Koinduktion der Arginasen und der iNOS als potentiell Instrument der (patho-)physiologischen Gegenregulation von übermäßigen NO-Wirkungen im Entzündungsgeschehen anzusehen. Indem sie eine modulierende Wirkung auf die NO-Bildung durch die Reduktion der biologischen Verfügbarkeit von Arginin für die NO-Synthasen entfalten, limitieren sie deren Potential für pathologische oder gar toxische Effekte durch zu hohe NO-Mengen (Chang et al., 1998; Hey et al., 1997). Zum anderen besitzen sie für Zellen, welche die Arginase stark exprimieren, proliferationsfördernde Eigenschaften über den Polyaminvorläufer Ornithin (Wu & Morris, 1998). Auf Nachbarzellen haben sie aber durch eben diesen Mechanismus eine proliferationslimitierende, auf mikrobielle Organismen eine bakteriostatische Wirkung, indem sie das zu ihrem Zellwachstum wichtige Substrat L-Arginin ausschöpfen (Clowes et al., 1980; Currie et al., 1979). Insbesondere Arginase II wird eher eine biosynthetische als eine katabole Rolle zugeschrieben, da sie vermehrt bei Reparaturvorgängen im Gewebe angetroffen wird (Que et al., 1998), und Prolin Bestandteil der extrazellulären Matrix ist (Trachtman et al., 1995). Auch die relative Persistenz der Arginase im Vergleich zu der induzierbaren NO-Synthase in entzündlichen Gebieten zeugt von ihrem Beitrag zur Wundheilung durch Hemmung der übermäßigen NO-Produktion und Steigerung der Polyaminsynthese (Waddington et al., 1998). Dennoch ist die physiologische Funktion der Arginase-Isoenzyme nicht vollständig geklärt, und ihre Expression und Regulation während inflammatorischer Vorgänge ist vermutlich komplexer als zur Zeit angenommen. Ferner ist unser heutiger Wissensstand bzgl. der Expression und Regulation der Arginase im Kontrast zu unserem umfangreichen Wissen über die NO-Synthasen in Makrophagen gering. Da aber die Arginasen, wie obenstehend aufgeführt, mittelbar Auswirkungen auf die NO-Synthese durch Erzeugung eines relativen Substratmangels haben (Zimmermann et al., 2003; Meurs et al., 2003; Hey et al., 1997), würde die Beleuchtung ihrer Regulation wiederum Aufschluss über die Regulation und Modulation der NO-Synthese liefern.

IV. Die NO-Synthasen

Die NOS-Enzyme wurden vor etwa mehr als zehn Jahren in ihrer konstitutiven Form im Gehirn (Bredt et al., 1991) und Gefäßendothel (Lamas et al., 1992) von Säugetierzellen und in ihrer induzierbaren Form in Makrophagen (Xie et al., 1992) entdeckt, was sich in der funktionellen Namensgebung cNOS und iNOS (c=konstitutiv, i=induzierbar), oder in der deskriptiven Namensgebung nach ihrer Herkunft, nNOS (n=neuronal) und eNOS (e=endothelial) widerspiegelt. Die Bezeichnungen der NO-Synthasen in der Literatur sind überlappend, so dass parallel auch die numerische Nomenklatur nach der historischen Reihenfolge der Enzymisolierung angetroffen wird. Obwohl die verschiedenen Isoenzyme sich bzgl. ihrer Expression im Gewebe und ihrer Regulation etwas unterscheiden, katalysieren sie jedoch ein und dieselbe Reaktion.

Die neuronale NO-Synthase wurde zunächst aus dem Kleinhirn der Ratte und des Schweines isoliert. Bald jedoch wurde sie auch in Rückenmark, sympathischen Ganglien und adrenergen Drüsen, in peripheren nitrergen Nerven, sog. nicht-cholinergen nicht-adrenergen-Neuronen (Abkürzung NANC), in Epithelzellen der Lunge und in der Skelettmuskulatur angetroffen. Die endotheliale NO-Synthase wurde außer in arteriellen und venösen Endothelzellen noch in der menschlichen Plazenta, in Tubulus-Epithelzellen der Niere und in Intestinalzellen des Hundes detektiert (Förstermann et al., 1995). Auch die induzierbare NO-Synthase beschränkt sich nicht nur auf die Makrophagen sondern kommt ferner in Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, Hepatozyten der Leber und in Alveolarmakrophagen der Lunge vor (Bandaletova et al., 1993). Unter den spezifischen Zelltypen bekunden v.a. Makrophagen und Endothelzellen eine Tendenz in Richtung NO-Produktion als den tragenden Anteil des L-Arginin-Metabolismus, obwohl wiederum Speziesunterschiede herrschen (Wu & Morris, 1998).

Die scheinbare Uniformität des Reaktionsmechanismus aller drei Isoenzyme vermag die offensichtlichen Unterschiede in der Dauer der NO-Produktion nicht zu erklären. Die Unterscheidung zwischen cNOS und iNOS spiegelt sich biochemisch in dem sog. Niedrig- und Hochleistungs-Stoffwechselweg wider, im angloamerikanischen

Sprachgebrauch als „low“ bzw. „high output“ bezeichnet. Die Aktivitäten der konstitutiven NOS-Enzyme werden dynamisch durch die Anwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin reguliert, während die iNOS, wenn sie einmal exprimiert ist, konstitutiv aktiv ist (Wu & Morris 1998). Die in der Regel konstitutiven calciumabhängigen nNOS und eNOS produzieren innerhalb von Sekunden kurzlebige (Sekunden bis Minuten pro Reaktionsepisode) geringe Quantitäten an NO im picomolaren Bereich, welche eine regulatorische Funktion bei der Neurotransmission und im kardiovaskulären System besitzen (Ignarro & Murrad, 1995). In intakten Zellen verhält sich die NO-Produktion durch die konstitutiven Enzyme proportional zu der bereits vorhandenen Enzymkonzentration (Weiss et al., 1994). Im Gegensatz dazu ist iNOS in der Lage NO in größeren Quantitäten, d.h. im nanomolaren Bereich, und über längere Zeiträume, z.B. in Mäusemakrophagen bis zu fünf Tagen, zu produzieren, wobei man mit einem verzögerten Aktivitätseintritt rechnen muss, bedingt durch die erst aktuell induzierte Enzymsynthese (Boucher et al., 1999; MacMicking et al., 1997). Außerdem bestehen quantitativ bedingte qualitative Unterschiede hinsichtlich der NO-Wirkung, da die konstant geringen Mengen an durch cNOS produziertes NO im Respirationstrakt einen bronchoprotektiven, dilatatorischen und antiinflammatorischen Effekt hervorrufen (Meurs et al., 2003), während die hohen iNOS-produzierten NO-Mengen lokal zytotoxische und autoaggressive Effekte haben können (Thomassen & Kavuru, 2001; MacMicking et al., 1997).

Studien haben auch zeitliche Unterschiede betreffs der Expression der iNOS und der Arginasen im Zusammenhang mit Entzündungen festgestellt. So wird iNOS in der frühen, während die Arginase vorzugsweise in der späten Phase der Entzündung angetroffen wird (Klasen et al., 2001; Boucher et al., 1999). NO, welches auf diesem Weg produziert wird, ist der hauptsächliche Effektor der zytotoxischen Wirkung von aktivierten Makrophagen auf Tumorzellen, Bakterien und Protozoen (Boucher et al., 1999). Da die Aktivität der iNOS viel größer als die der anderen Isoenzyme ist, ist ihre Nachfrage nach dem Substrat L-Arginin entsprechend groß. Ganz generell gesprochen dient der Niedrigleistungs-Weg der nNOS und eNOS physiologischen Funktionen, während der Hochleistungs-Weg der iNOS bei der Entzündung und Infektion eine Rolle spielt (MacMicking et al., 1997). Die subzelluläre Lokalisation der drei Isoenzyme wird immer noch kontrovers angegeben. nNOS und iNOS werden

bisweilen als lösliche zytosolische Proteine charakterisiert, während eNOS mit der Plasmamembran in unmittelbarem Zusammenhang gebracht wird (Ricciardolo, 2003). Die Aufklärung der genauen subzellulären Lokalisation der NOS-Isoenzyme und ihre physiologische Bedeutung wird die Forschung offenbar noch eine Zeit lang beschäftigen.

NOS und Lunge

Die Lunge ist reich an allen drei NOS-Isoenzymen. Die endotheliale NO-Synthase befindet sich in Endothelzellen, Bronchial- und Alveolarepithelzellen, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen. Die neuronale NO-Synthase vermittelt u.a. die nicht-adrenerge nicht-cholinerge neuronale inhibitorische Antwort in den menschlichen Atemwegen entweder direkt oder via NO-tragender Metabolite. Als NANC-System wird die funktionelle Einheit aus inhibitorischen und exzitatorischen nicht-adrenergen nicht-cholinergen Neuronen verstanden, deren Transmitter Neuropeptide wie z. B. Substanz P, VIP oder NO sind und bei der Regulation des Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstrakts involviert sind (Nathan & Xie, 1994; Moncada & Higgs, 1993). Erregungen, die über die nicht-adrenergen nicht-cholinergen Wege laufen, resultieren im Respirationstrakt in Bronchodilatation und wirken der Bronchokonstriktion vagalen Ursprungs entgegen (Belvisi et al., 1992). So trägt die Freisetzung von NO aus den orts- und gewebständigen Immunzellen bzw. Neuronen zur pulmonalen Bronchodilatation auf zwei Wegen bei. Zum Einen produzieren das respiratorische Epithel und pulmonale Parenchym selbst eine basale Menge an NO zur Aufrechterhaltung des physiologischen Bronchialtonus im Sinne eines humoralen Effektors, zum anderen bewirkt das koexistente NANC-System eine neuronal vermittelte Bronchodilatation mit NO als Neurotransmitter (Ashutosh, 2000). Nach gleichem Muster ist eine kontinuierliche, lokale, von dem pulmonalen Gefäßendothel stammende Basalmenge NO für die Wahrung des vaskulären Tonus in kleinen Arterien und Arteriolen verantwortlich, während eine Vasodilatation ebenfalls durch das NANC-System neural vermittelt werden kann. Die induzierbare NO-Synthase wird in Bronchial-Epithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Lunge angetroffen. Primärmakrophagen exprimieren als Entzündungszellen situationsadaptiert neben den ohnehin geringen Mengen an der konstitutiven eNOS überwiegend die induzierbare Form der NO-Synthase (Miles et al., 1998; MacMicking et al., 1997). Da

in diesem Zusammenhang besonders die Expression der Hochleistungs-Form der NO-Synthasen, der iNOS, bei Asthma und anderen entzündlichen Lungenpathologien gesteigert und mit abnorm erhöhten NO-Werten in der Ausatemluft der betroffenen Individuen assoziiert ist (Kharitonov & Barnes, 2001), ist es indiziert, unser Augenmerk auf die induzierbare NO-Synthase zu richten.

Normales, menschliches Epithel der größeren Atemwege zeichnet sich in vivo, zunächst wider Erwartung, durch seine iNOS-Positivität aus (Kobzik et al., 1993). Dies ist jedoch verständlich, wenn man bedenkt, dass es unter physiologischen Bedingungen rezidivierend bakteriellen Endotoxinen, Ozon und anderen induktiven Stimuli mehr oder minder ausgesetzt ist. Werden dieselben Zellen in Kultur gelegt, verlieren sie ihre iNOS (Guo et al., 1995). Tatsächlich agieren zahlreiche Zytokine und bakterielle Produkte oft synergistisch in der Stimulation der iNOS-Expression. Auch einige Nicht-Zytokine sind in der Lage, iNOS zu induzieren oder ihre Induktion zu verstärken (Nathan, 1997).

Regulationsmechanismen

Die Regulation der Aktivität eines Enzyms kann erstens durch die aktuelle Syntheserate desselben, zweitens durch seine katalytische Aktivität und drittens durch seine Degradierung bewirkt werden. In Bezug auf die NO-Produktion existieren verschiedene Kontrollmechanismen, welche u.a. sowohl eine Regulation auf Transkriptions- als auch auf Posttranskriptionsebene beinhalten (Ding et al., 1998; Geller et al., 1993). Posttranslationell kommt eine kompetitive Endprodukthemmung sowohl im Sinne einer Autoregulation als auch im Sinne einer Kreuzregulation durch die Arginasen-Produkte zur Geltung (Mössner et al., 2001; Hrabák et al., 1996). Umgekehrt resultiert eine Inhibition der Arginasen-Aktivität in gesteigerte NO-Produktion in Alveolarmakrophagen der Ratte nach deren Aktivierung (Hey et al., 1997). Über eine posttranslationelle Modifikation im Sinne einer Phosphorylierung wurde insbesondere im Falle der neuronalen und endothelialen NOS berichtet. Die neuronale Form wird an Serin/Threonin-Resten durch die Protein-Kinase II und durch die Protein-Kinasen A, C und G phosphoryliert, wobei dies eine Minderung ihrer katalytischen Aktivität herbeiführt (Dinerman et al., 1994; Nakane et al., 1991). Als Stimulus wurden in der Literatur u.a. Östrogene vorgeschlagen, welche sowohl die nNOS-mRNA als auch ihre Aktivität hochregulierten, die verwendeten

Konzentrationen befanden sich jedoch oberhalb des physiologischen Bereichs (Weiner et al., 1994). Die endotheliale Form kann ebenfalls unter der Wirkung von Bradykinin oder von Scherkräften an ihren Serin-Resten phosphoryliert werden. Dies ist jedoch mit einer Aktivitätssteigerung des Enzyms vergesellschaftet (Boo et al., 2002; Michel et al., 1993).

Die Stimulation der induzierbaren NO-Synthase ist nicht einheitlich und in der Regel gewebsspezifisch. Ihre Regulation findet primär auf Expressionsebene statt (Eissa et al., 1996; Xie et al., 1992), aber parallel existieren auch posttranslationelle Modifikationsmechanismen, wenn sie auch nur als Ergänzung angesehen werden (Kolodziejcki et al., 2004; Miura et al., 1997). Es gibt Substanzen, welche in der einen Zellart eine Aktivierung hervorrufen, während sie in anderen Zelltypen das Gegenteil bewirken (Weiner et al., 1994). Pharmakologische Spiegel von immunsupprimierenden Glukokortikoiden z. B. sind in der Lage die iNOS-Induktion in Ratten-Alveolarmakrophagen oder mesangialen Zellen zu unterdrücken (Klasen et al., 2001; Kunz et al., 1996).

V. NO

Das Produkt der NO-Synthasen ist das kurzlebige und farblose Gasmolekül Stickstoffmonoxid. Es entsteht durch oxidativen Metabolismus von L-Arginin unter Bildung des Co-Produktes L-Citrullin (Lamas & Michel, 1997). Es ist lipid- und wasserlöslich und reagiert in Wasser mit Sauerstoff, um innerhalb von Sekunden andere reaktive Metabolite zu erzeugen (MacMicking et al., 1997). Die biologischen Wirkungen werden entweder von NO selbst oder von seinen sekundären Stickstoffverbindungen getragen (Grisham et al., 1999). Vereinfachend wird auf beide Gruppen oft mit „NO“ als Sammelbegriff Bezug genommen. Dieses radikale Botschaftermolekül vermittelt und reguliert verschiedene biologische Funktionen – entweder bei niedriger Konzentration als Signal in vielen physiologischen Prozessen, welche, wie initial bereits angesprochen, u.a. die Hämodynamik und rheologischen Eigenschaften des Blutes, die Plättchen-Reaktivität, die Gen-Transkription (Peunova & Enikopolov, 1993), die mRNA-Translation (Weiss et al., 1994), die kardiale Kontraktilität beinhalten (Moncada & Higgs, 1993), oder bei höherer Konzentration als zytotoxischer und zytostatischer Abwehrmechanismus gegen Tumore und

Pathogene fungieren (Moncada & Higgs, 1993). Im vaskulären System vermittelt NO vasodilatatorische Effekte und greift somit in die Regulation des Blutdrucks ein, während es im zentralen Nervensystem als Neurotransmitter fungiert und u.a. für das Gedächtnis verantwortlich ist. Überdies existiert peripher ein Netzwerk von nitrergen Fasern, welches zum bereits erwähnten NANC-System mit polytopen Effekten gehört (Nathan & Xie, 1994; Moncada & Higgs, 1993). Entdeckungen von einem erhöhten NO-Gehalt im Rahmen von inflammatorischen Prozessen des Respirationstraktes, wie z.B. bei Asthma bronchiale, deuten auf seinen immunmodulatorischen Beitrag bei pulmonalen Erkrankungen hin (Alving et al., 1993).

NO diffundiert rasch vom Ort seiner Synthese und ist in der Lage Zellmembranen zu durchdringen, so dass kein Bedarf an extrazellulären NO-Rezeptoren auf den Zielzellen zur Entfaltung der NO-Wirkung besteht. Seine multiplen Wirkungen werden u. a. mittels Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mit nachfolgendem Anstieg der cGMP-Konzentration in den Zielzellen in Gang gesetzt. Die Aktivität von NO ist von vielen lokalen Faktoren abhängig, u.a. von der Menge und der Aktivität der produzierenden Enzyme und vom oxidativen Stress (Ricciardolo, 2003).

Sowohl ein Mangel als auch ein Exzess an NO werden für die Pathogenese einer Anzahl von Krankheiten mit entzündlicher Komponente verantwortlich gemacht (Thomassen & Kavuru, 2001; Moncada & Higgs, 1995). Die ersten Fälle wurden bei Hypertension, Atherosklerose und vaskulärer Restenosierung beobachtet. Die Anwendung verschiedener NO-Donoren kann die Unterproduktion teilweise kompensieren. Im Gegensatz dazu wird eine Anzahl von Krankheiten in Zusammenhang mit einem Überschuss an durch die iNOS produziertem NO gebracht. Zu diesen gehören u.a. rheumatische Erkrankungen, septische Schockzustände, Diabetes mellitus, Asthma bronchiale und zerebrale Ischämien (Moncada & Higgs, 1995; Knowles & Moncada, 1994). Der therapeutische Ansatz bestünde in solchen Fällen in der Gabe von Isoenzym-selektiven Inhibitoren insbesondere bei der Behandlung chronischer Krankheitszustände.

NO in den Atemwegen

Die Produktion von NO im Respirationstrakt ist nicht auf eine Zellart beschränkt sondern beinhaltet alle bereits erwähnten Gewebearten d.h. das respiratorische

Epithel, die Atemwegsneurone, unspezifische Entzündungszellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen und das vaskuläre Endothel (Barnes & Belvisi, 1993). NO ist ein wichtiger Modulator der Lungendurchblutung und des dortigen Ventilations-Perfusionsverhältnisses. NO ist aber auch bei gewebsschädigenden Prozessen involviert, denn seine zytostatischen und zytotoxischen Wirkungen richten sich nicht nur gegen eindringende Mikroorganismen, sondern auch gegen Proteine und Aminosäuren von Wirtszellen, einschließlich der Zellen, die es produzieren (Morri et Gotoh, 2004, Moncada & Higgs, 1993).

NO und Bronchodilatation

NO verursacht eine Bronchodilatation, indem es die glatte Muskulatur der Atemwege zur Relaxation veranlasst (Meurs et al., 2000). Neben Adrenalin, Acetylcholin, Histamin und andere Mediatoren wird der Bronchialdurchmesser beim Menschen durch NO beeinflusst (Belvisi et al., 1992; Ellis & Udem, 1992). Die NOS-immunoreaktiven Neurone werden in parasymphatischen, sympathischen und sensorischen Ganglien angetroffen, welche die glatte Muskulatur des Respirationstrakts versorgen (Fischer et al., 1996), und welche in den proximalen Atemwegen präsenter sind als in den distalen (Ward et al., 1995). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die primär alveolär- und interstitiellbasierte Lungencompliance bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung nach Inhalation von NO keine Veränderung aufweist, dass aber der Atemwegwiderstand von Asthmatikern, der sich v.a. aus den Widerständen in den oberen Atemwegen zusammensetzt, in einigen Fällen abnimmt (Högmann et al., 1993).

NO und Bronchoprotektion

Eines der Hauptcharakteristika von Asthma ist die bronchiale Hyperreaktivität, im Rahmen derer es zu einer gesteigerten reaktiven Bronchokonstriktion kommt. Im Tiermodell konnte die modulierende Funktion von endogenem NO im Sinne einer protektiven Wirkung bei der Sofortreaktion von Asthma demonstriert werden (Persson et al., 1993). Die mechanische Entfernung des respiratorischen NO-bildenden Epithels hatte bei gleichem Stimulantienegebrauch Kontraktionen der subepithelialen glatten Muskulatur zur Folge (Filep et al., 1993), was dem Epithel nicht lediglich die Rolle einer physikalischen Schutzbarriere, sondern die eines

bedeutenden Regulators der Bronchomotorik verleiht (Ricciardolo, 2003). Aufgrund der mit Asthma und anderen chronischen pulmonalen Prozessen einhergehenden degenerativen Epithelveränderungen, des sog. Airway-Remodellings, muss das Epithel seine NO-bedingte bronchoprotektive Wirkung langfristig einbüßen, so dass die Krankheit durch Chronifizierung eigendynamisch in einen Teufelskreis gerät. Zur bronchoprotektorischen Funktion von NO gehört auch sein Mitwirken bei der natürlichen Desinfizierung der respiratorischen Mukosa mit nachfolgender Reduktion der lokalen Empfänglichkeit für Infektionen der unteren Atemwege (Ashutosh, 2000).

NO und Sekretion in den Atemwegen

NO ist an der gesteigerten Sekretion von Bronchialflüssigkeit als Antwort auf Entzündungsmediatoren beteiligt (Adler et al., 1995). Gleichzeitig wird die ziliare Motilität durch Erhöhung der Schlagfrequenz intensiviert und somit die pathogenabwehrende Klärfunktion des Epithels gesteigert (Jain et al., 1993). Entscheidend für den Nutzen sind die Menge an NO und die Dauer seiner Anwesenheit.

NO und Atemwegsentszündung

Alternierungen der überregionalen neurogenen und lokalen nicht-neurogenen Kontrolle der glatten Bronchialmuskulatur, ebenso wie lokaler Parenchymbau beispielsweise durch Verdickung der Basalmembran, subepitheliale Fibrose und eine absolute Massenzunahme an glatter Atemwegsmuskulatur, liefern das pathophysiologische Korrelat zur bronchialen Obstruktion (Bousquet et al., 2000). Untersuchungen über die bronchiale Hyperreagibilität konzentrieren sich aus diesem Grunde zunächst auf zelluläre und molekulare Ereignisse nach Allergenexposition von Tieren oder Menschen. In diesem Rahmen durchgeführte klinische und experimentelle Studien identifizierten eine signifikant erhöhte IgE-Bildung, mukosale Dys- und Hyperkrinie, Atemwegsobstruktion und Entzündung als charakteristische Reaktionsmerkmale gegenüber spasmogenen Elementen (Busse et al., 2001).

Eine anhaltend gesteigerte Produktion von endogenem NO resultiert in einen langfristig schädigenden Effekt und ist möglicherweise in der eosinophil geprägten chronischen Entzündung bei Asthma kausal involviert. Bei entsprechender Dosis verursacht NO in den Atemwegen einen mikrovaskulären Leck, welcher zur

Entwicklung eines lokalen Ödems mit resultierender Rekrutierung von Eosinophilen aus dem Blut führen kann. Asthma ist mit einer lokal gesteigerten NO-Produktion assoziiert, hervorgerufen durch eine verstärkt exprimierte iNOS, was nachteilige Effekte auf die lokale Anatomie, Physiologie und daraus resultierende Funktion des Respirationstrakts nach sich zieht (Ricciardolo, 2003). Tatsächlich ist Stickstoffmonoxid mit seinem dualen Charakter dosisabhängig sowohl an der Regulation des physiologischen Bronchialtonus als auch an asthmatischen Zuständen beteiligt (Barnes & Belvisi, 1993). Die Koregulation des Bronchialtonus durch die geringen cNOS-gebildeten NO-Mengen unter physiologischen Umständen wirken nicht nur über eine direkte Bronchodilatation, sondern auch indirekt über Variierungen des Durchmessers der angrenzenden Bronchialgefäße. Die hohen Dosen, die von der induzierbaren Form produziert werden, haben primär entzündungsmodulierende Eigenschaften und können, da in höheren Konzentrationen freigesetzt, aus der antiinflammatorischen auf die proinflammatorische Seite geraten. Dieses duale Potential von NO für einerseits nützliche und andererseits schädigende Wirkungen wird an iNOS-Knock-out-Mäusen deutlich, die zwar aufgrund des Fehlens der bakteriziden Wirkung von NO allgemein empfänglicher für Infektionen sind, deren Leidensdruck aber im Sinne der klinischen Symptomatik durch das gleichzeitige Fehlen der gewebsschädigenden NO-Nebenwirkungen insgesamt geringer ausgeprägt ist (Nathan, 1997).

Pharmakologisches Paradoxon

Oft wurde in der Literatur der therapeutische Einsatz von NO-Donoren und selektiven NOS-Inhibitoren mit iNOS im Visier diskutiert, Behandlungsmaßnahmen, die auf dem dualen protektiven/destruktiven Charakter von NO basierten. Im Rahmen von Studien bewirkte die Applikation geringer Mengen NO in erster Linie eine akute bronchodilatatorische Wirkung, während man bei langwierigen, entzündlichen Prozessen bemüht war, die iNOS zu reduzieren oder auszuschalten, um ihre verheerenden Folgen zu verhindern. Insgesamt war aber der therapeutische Nutzen von NO uneinheitlich mal als signifikant (MacMicking et al., 1997) mal als nicht signifikant (Ashutosh, 2000) bezeichnet worden, so dass bis dato dieses Verfahren wissenschaftlich noch nicht etabliert ist.

Insgesamt besteht eine eindrucksvolle Parallelität zwischen den NO-Synthasen und den Arginasen. Beide Enzyme besitzen speziesabhängig konstitutive und induzierbare Isoformen, und sie konsumieren das gleiche Substrat. Sie werden unter inflammatorischen Umständen häufig koinduziert und in Makrophagen durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert (Wang et al., 1995). Besonders in der Asthma-Pathogenese gehören sie zu den Schlüssel-Enzymen; sowohl die Gene der iNOS als auch die der Arginasen gelten als sog. Signatur- bzw. Erkennungsgene bei Asthma (Zimmermann et al., 2003). Außerdem existiert zwischen beiden Enzymen eine enge, gegenseitige Beeinflussung mit Auswirkungen auf ihre Umsatzleistungen. Die Koinduktion der Arginasen und der iNOS (Wang et al., 1995), die Induktion der Arginasen durch Suppressoren der iNOS (Corraliza et al., 1995), und die Identifizierung von Substanzen, welche die Expression beider Enzyme koregulieren (Que et al., 1998) unterstützen die Hypothese, dass die Arginase für die Regulation der NOS-Aktivität durch Beeinflussung der lokalen Arginin-Verfügbarkeit wichtig ist (Hecker et al., 1995). Da beide Enzyme zur Hauptausstattung immunkompetenter Zellen gehören v.a. der mononukleären Linie, und Änderungen in ihrem Expressionsmuster in Verbindung mit verschiedenen Pathologien gebracht werden, ist es angebracht die molekularbiologischen Ereignisse ihrer Regulation näher zu beleuchten.

B. ZIELSETZUNG

Änderungen der Arginin-Homöostase in der Säugetierzelle werden kausal mit verschiedenen Pathologien insbesondere der Atemwege assoziiert (Meurs et al., 2003; Thomassen & Kavuru, 2001). Dabei besteht eine enge funktionelle Verknüpfung zwischen den zwei Schlüsselenzymen dieses Stoffwechselwegs, der induzierbaren Form der Stickstoffmonoxid-Synthase und den Arginasen, durch das gemeinsame Substrat L-Arginin im Sinne einer Konkurrenzsituation mit wesentlichen quantitativen Auswirkungen auf ihre Metabolisierungsprodukte und somit ihren Folgen.

Im Rahmen unserer Versuchsreihe beabsichtigten wir, die vorgeschalteten Prozesse solcher quantitativen Endproduktveränderungen sowohl auf Ebene der Enzymaktivität selbst als auch auf Ebene der Gen- bzw. Proteinexpression unter dem Aspekt der reversiblen Proteinphosphorylierung bzw. Dephosphorylierung als Regulationsmechanismus zu rekonstruieren. So galt es in der vorliegenden Arbeit, zunächst die Basalexpression der drei wesentlichen intrazellulären Phosphatase-1-Isoenzyme sowie der Phosphatase 2 in Alveolarmakrophagen am Modell der Ratte zu untersuchen, um dann ihre funktionelle Bedeutung auf die iNOS und die Arginasen im Allgemeinen und unter dem Einfluss pharmakologischer Stimuli auf den o. g. Regulationsebenen zu ermitteln. Auf die einzelnen Methoden und ihre Aussagekraft wird in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. MATERIAL

I.1. Chemikalien und Enzyme

SUBSTANZ	HERSTELLER
Amphotericin B, wasserlöslich	Sigma
L-Arginin-Hydrochlorid	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Bio-Rad
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
DMEM - F12 HAM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F12 HAM [1:1])	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
DNA-Polymerase	Invitrogen
EDTA (Na ₂ Ethylendiamintetraacetat Dihydrat)	Merck
Ethanol (absolut)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Sigma
Fixierer-Stammlösung	Sigma
FKS (Fetales Kälberserum [SO115])	Biochrom
Glycin	Roth
Harnstoff	Merck
Isopropanol	Merck
ISPF (α -Isonitrosopropiophenon)	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Leupeptin	Sigma
LPS (Lipopolysaccharid von E. coli 0127: B8)	Sigma
Lumineszenz-Lösung	Boehringer
Lysis-Lösung	Eppendorf
Magermilchpulver 0,9% Fett	Sucofin
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ 50mM)	Invitrogen
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ 6 x H ₂ O)	Merck

Mangan(II)-chlorid Dihydrat (MgCl₂ x 2H₂O)	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Molecular Biology Water	Eppendorf
MTT	Sigma
MTT-Formazan	Sigma
N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin Dihydrochlorid	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	Merck
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck
Natriumnitrit (NaNO₂)	Merck
Nonidet P40	Boehringer
Okadeinsäure (Prorocentrum concavum)	Calbiochem
Oligonukleotid (dT)₁₈	MWG
PCR-dNTP-Mix (10 mM)	Sigma
PCR-Primer	MWG
PCR-Puffer – MgCl₂ 10 x	Invitrogen
Penicillin / Streptomycin-Lösung (10.000 U ml⁻¹ / 10 mg ml⁻¹)	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Phosphorsäure 85-90% (H₃PO₄)	Merck
Ponceau S	Sigma
PFSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
D_c (Detergent Compatible) Protein Assay mit Reagenzien A, B, S	Biorad
Omniscrypt Reverse Transkriptase	Qiagen
RNA-Präparationskit	Eppendorf
Roti-Load-Puffer	Roth
RT-dNTP-Mix 5 mM	Qiagen
RT-Puffer 10 x	Qiagen
Salzsäure 37%	Merck
Schwefelsäure 95-97% (konz. H₂SO₄)	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Pharmacia
Serumalbumin, bovin (BSA)	Sigma
Smart Ladder 200 Banden (DNA-Leiter)	Eurogentec
Starter-Lösung	Boehringer
Sulfanilamid	Merck
Taq-Polymerase	Invitrogen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Tris HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- Hydrochlorid)	Boehringer
Triton x 100	Pharmacia
Trypan Blue Stain (0,4%)	Sigma

Tween 20

Sigma

Wasch-Lösung 1 + 2

Eppendorf

I.2. Lösungen und Puffer

1,2% Agarose-Gel (Ansatz: 150 ml)

Agarose	1,8 g	1,2% (w/v)
0,5 x TBE-Puffer	150 ml	
-in der Mikrowelle aufkochen lassen		
1% Ethidiumbromid-Lösung	5 µl	0,03% (w/v)
- heiße Agarose-Lösung in Gelgießkammer gießen		

2,5 mg ml⁻¹ Amphotericin B-Lösung (Ansatz: 20 ml)

Amphotericin B	50 mg	2,5 mg ml ⁻¹
steriles Wasser	ad 20 ml	

0,5 M L-Arginin-Lösung pH 9,7 (Ansatz: 10 ml)

L-Arginin Hydrochlorid	1,0535 g	0,5 M
Aqua bidest.	5 ml	
- mit 5 M NaOH pH 9,7 einstellen		
25 mM Tris-HCl-Lösung pH 9,7	ad 10 ml	
Lösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen!		

Basismedium (Ansatz: 1000 ml)

DMEM-F12 HAM	1 Portion	
steriles Wasser	1000 ml	
- gut auflösen		
NaHCO ₃	2,4 g	2,4 g l ⁻¹

0,5% Blocking-Lösung (Ansatz: 32 ml)

1% Blocking-Lösung	16 ml
TBS-Lösung	16 ml

1% Blocking-Lösung (Ansatz: 30 ml)

Magermilchpulver	300 mg
TBS-Lösung	30 ml

4 mg ml⁻¹ BSA-Standard-Lösung (Ansatz: 2 ml)

BSA	8 mg	4 mg ml ⁻¹
0,1% Tris-Triton-Lösung	ad 2 ml	

Lagerung bei -20°C zum regelmäßigen Einsatz.

DEPC-Wasser (Ansatz: 100 ml)

DEPC	200 µl	0,2% (v/v)
steriles Wasser	ad 100 ml	

Intensiv schütteln, damit das DEPC in Lösung geht! Die Lösung anschließend autoklavieren zur Inaktivierung von überschüssigem DEPC!

Detektionslösung (Ansatz: 5 ml)

Starter-Lösung	30 ml	1% (v/v)
Lumineszenz-Lösung	ad 3 ml	

0,1 M EDTA-Lösung pH 8 (Ansatz: 20 ml)

EDTA	744 mg	0,1 M
Aqua bidest.	15 ml	
- mit 1 M NaOH pH 8 einstellen		
Aqua bidest.	ad 20 ml	

5 x Elektrodenpuffer pH 8,3 (Ansatz: 600 ml)

Tris	9 g	125 mM
Glycin	43,2 g	7,2% (w/v)
SDS	3 g	5% (w/v)
Aqua bidest.	ad 600 ml	

Entwickler-Lösung (Ansatz: 300 ml)

Entwickler-Stammlösung	60 ml	20% (v/v)
Aqua bidest.	ad 300 ml	

75% Ethanol (Ansatz: 50 ml)

Ethanol (absolut)	37,5 ml	75% (v/v)
steriles Wasser	12,5 ml	

1% Ethidiumbromid-Lösung (Ansatz: 10 ml)

Ethidiumbromid	100 mg	1% (w/v)
Aqua bidest.	ad 10 ml	

Fixierer-Lösung (Ansatz: 300 ml)

Fixierer-Stammlösung	60 ml	20% (v/v)
Aqua bidest.	ad 300 ml	

Griess-Reagenz (Ansatz: nach Bedarf; exemplarisch 50 ml)

Sulfanilamid	500 mg	1% (w/v)
N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin- dihydrochlorid	50 mg	0,1% (w/v)
2,5% (w/v) Phosphorsäure	50 ml	

Die Substanzen lösen sich unter Rühren nach ca 1 h in der Phosphorsäure. Da das Reaktionsgemisch lichtempfindlich ist, dunkel halten!

Harnstoff-Stammlösung (Ansatz: 10 ml)

Harnstoff	50 mg	5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$
Aqua bidest.	ad 10 ml	

0,5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Harnstoff-Standardlösung (Ansatz: 1 ml)

Harnstoff-Stammlösung	100 μl	0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Triton-Tris-Mn-Lösung	900 μl	

5% HCl-Lösung (Ansatz: 400 ml)

konz. HCl (37%)	54 ml	5% (v/v)
Aqua bidest.	ad 346 ml	

10% HCl-Lösung (Ansatz: 500 ml)

konz. HCl (37%)	135 ml	10% (v/v)
Aqua bidest.	ad 500 ml	

2,5% H₃PO₄-Lösung (Ansatz: 200 ml)

85% (w/v) Phosphorsäure	5,88 g	2,5% (w/v)
Aqua bidest.	200 ml	

9% ISPF-Lösung (Ansatz: 10 ml)

ISPF	900 mg	9% (w/v)
Ethanol	ad 10 g	

1 mg bzw. 10 µg ml⁻¹ Leupeptin-Lösung (Ansatz: 5 ml)

-Stocklösung:

Leupeptin	5 mg	1 mg ml ⁻¹
Aqua bidest.	5 ml	

→ Lagerung der 1 ml Aliquots bei -20°C

-Arbeitslösung:

1 mg ml ⁻¹ Leupeptin Lösung	100 µl	10 µg ml ⁻¹
Aqua bidest.	9900 µl	

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

1,2% Agarose-Gel

1% Ethidiumbromid-Lösung

5 x TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Puffer

Lösungen für Arginase-Assay

0,5 M L-Arginin-Lösung pH 9,7

0,1 M EDTA-Lösung pH 8

Harnstoff-Stammlösung

0,5 $\mu\text{g } \mu^{-1}$ Harnstoff-Standardlösung
9% ISPF-Lösung
500 mM $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung
100 mM PMSF-Lösung (Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung)
Säuremix
500 mM Tris-HCl-Lösung
25 mM Tris-HCl / 5 mM MnCl_2 -Lösung pH 7,4
0,1% Triton x 100-Lösung
Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren
Triton-Tris-Mn-Lösung

Lösungen für MTT-Vitalitätsassay

MTT
MTT-Formazan

Lösungen für Nitritbestimmung

Griess-Reagenz
2,5% H_3PO_4 -Lösung
1 M NaNO_2 -Standardlösung

Lösungen für Protein-Bestimmung

4 mg ml^{-1} BSA-Standard-Lösung
Reagenz AS
1% Tris-Triton-Lösung

Lösungen für die Proteingelektrophorese

5 x Elektrodenpuffer (Laufpuffer) pH 8,3

Lösungen für Protein-Präparation aus Ratten-Alveolarmakrophagen

10 mM MgCl_2 -Lösung
100 mM NaCl-Lösung
Nonidet P40-Puffer mit Protease-Inhibitoren
PBS-Lösung mit Protease-Inhibitoren
100 mM Tris-HCl-Lösung pH 7,5

Lösungen für RNA-Präparation aus Ratten-Alveolarmakrophagen

Perfect RNAtm, Eukaryotic, Mini von Eppendorf:

- Lysis Solution
- Molecular Biology Water
- Perfect RNA Binding Matrix Solution
- Wash Solution 1 + 2

Lösungen für Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

DEPC-Wasser

PCR-Master-Mix

RT-Master-Mix

10 μ M Oligo(dT)₁₈-Primer-Lösung

5 x TBE-Puffer

0,5 x TBE-Puffer

Probenpuffer

Lösungen für den Western Blot

1% Blocking-Lösung

0,5% Blocking-Lösung

Detektionslösung

Entwickler-Lösung

Fixierer-Lösung

Ponceau S-Lösung

Primärantikörper-Lösung

Sekundärantikörper-Lösung

TBS (Tris buffered saline)-Lösung pH 7,5

TBST (TBS mit Tween 20)-Lösung

Transferpuffer

LPS-Lösung (Lipopolysaccharid-Lösung)

- Stocklösung:

LPS-Pulver

1 mg

1 mg ml⁻¹

Sterile PBS-Lösung 1 ml

→ Lagerung der 100 µl Aliquots bei -20°C

- Arbeitslösung:

1 mg ml⁻¹ LPS-Stocklösung 10 µl 100 µg ml⁻¹

Sterile PBS-Lösung 90 µl

Makrophagen-Medium (Ansatz: 200 ml)

Basismedium 187,6 ml

FKS 10 ml 5% (v/v)

Penicillin / Streptomycin-Lösung 2 ml 100 U ml⁻¹

2,5 mg ml⁻¹ Amphotericin B-Lösung 400 µl 5 µg ml⁻¹

10 mM MgCl₂-Lösung (Ansatz: 10 ml)

MgCl₂ x 6H₂O 20,33 g 1 M

Aqua bidet. ad 100 ml

500 mM MnCl₂ x 2 H₂O-Lösung (Ansatz: 10 ml)

MnCl₂ x 2H₂O 809,4 mg 500 mM

Aqua bidet. ad 10 ml

MTT-Lösung (Ansatz: 10 ml bzw. 1 ml)

- Stocklösung:

MTT 1 g 100 mg ml⁻¹

DMSO 10 ml

→ Lagerung der 1 ml Aliquots bei -20°C

- Arbeitslösung:

100 mg ml⁻¹ MTT-Stocklösung 2,5 ml 0,5 mg ml⁻¹

Primärmedium 497,5 µl

MTT-Formazan-Lösung (Ansatz: 5 ml)

MTT-Formazan 250 mg 50 mg ml⁻¹

DMSO 5 ml

100 mM NaCl-Lösung (Ansatz: 10 ml)

100 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O	20,3 mg	10 mM
Aqua bidest.	ad 10 ml	

1 M NaNO₂-Standardlösung (Ansatz: 200 ml)

NaNO ₂	69 mg	1 M
Aqua bidest.	ad 1 ml	

Die Nitrit-Standards dürfen zum regelmäßigen Einsatz bei –20°C gelagert werden.

0,2% (w/v) Natriumhydroxid-Lösung (Ansatz: 500 ml)

NaOH	1 g	0,2% (w/v)
Aqua bidest.	ad 500 ml	

Nonidet P40-Puffer mit Protease-Inhibitoren (Ansatz: 10 ml bzw. 1 ml)

100 ml Tris-HCl pH 7,5	1 ml	10 mM
100 mM NaCl-Lösung	1 ml	10 mM
10 mM MgCl ₂ -Lösung	1 ml	1 mM
100% (v/v) Nonidet P-40	50 µl	0,5% (v/v)
Aqua bidest.	6094 µl	

→ Lagerung der Aliquots bei 4°C

- unmittelbar vor Gebrauch zugeben:

100 mM PMSF	10 µl	170 µg ml ⁻¹
0,1 M EDTA-Lösung pH 8	20 µl	2 mM
125 µg ml ⁻¹ Pepstatin A-Lösung	5,6 µl	0,7 µg ml ⁻¹ (1µM)
10 µg ml ⁻¹ Leupeptin-Lösung	50 µl	0,5 µg ml ⁻¹ (1µM)

Okadeinsäure-Lösung

- Stocklösung:

Okadaic Acid	25 µg	100 µM
DMSO	310,55 µl	

- Arbeitslösung (Verdünnung 1:1000)

→ 100 µM Okadaic Acid-Lösung: 10 µM

Verdünnung 1:10 mit DMSO

→ 10 µM Okadaic Acid-Lösung 1 µM
 Verdünnung 1:10 mit DMSO
 → 1 µM Okadaic Acid-Lösung 100 nM

10µM Oligo(dT)₁₈-Primer-Lösung

Oligonukleotid (dT) ₁₈	x mg	100 µM
DEPC-Wasser	x µl	

- Lösung in dem von der Firma MWG vorgegebenen Volumen DEPC-Wasser zu 100 M ansetzen

- Verdünnung 1 : 10 mit DEPC-Wasser zu 10 µM

10 x PBS (phosphate buffered saline)-Puffer pH 7,4-7,5 (Ansatz: 1000 ml)

KCl	2 g	27 mM
KH ₂ PO ₄	2 g	15 mM
NaCl	80 g	1,38 M
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	11,5 g	81 mM
Aqua bidet.	ad 1000 ml	

PBS-Lösung mit Protease-Inhibitoren (Ansatz: nach Bedarf; exemplarisch 10 ml)

1 x PBS-Puffer	9,144 µl	
100 mM PMSF-Lösung	150 µl	1 mM
0,1 M EDTA-Lösung pH 8	300 µl	2 mM
125 µg ml ⁻¹ Pepstatin-Lösung	84 µl	1 µM
10 µg ml ⁻¹ Leupeptin-Lösung	750 µl	1 µ

PCR-Master-Mix (Ansatz: je nach Probenzahl n für (n+1) Proben)

10 x PCR-Puffer	n+1 x 5 µl
50 mM MgCl ₂	n+1 x 1,5 µl
10 mM dNTPs	n+1 x 1 µl
evtl. DMSO	n+1 x 2,5 µl
5 U µl ⁻¹ Taq Polymerase	n+1 x 0,5 µl

Bei Gabe von DMSO → Erhöhung des zu pipettierenden Volumens um 2,5 µl.

125 µg ml⁻¹ Pepstatin A-Lösung (Ansatz: 4 bzw. 1 ml)

-Stocklösung:

Pepstatin A	5 mg	1,25 mg ml ⁻¹
Methanol	4 ml	

→ Lagerung der 1 ml Aliquots bei -20°C

-Arbeitslösung:

1,25 mg ml ⁻¹ Pepstatin A	100 µl	125 µg ml ⁻¹
Methanol	900 µl	

100 mM PMSF-Lösung (Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung) (Ansatz: 10 ml)

PMSF	174 mg	100 mM
Isopropanol	10 ml	

→ Lagerung der 500 µl Aliquots bei -20°C

0,2% Ponceau S-Lösung (Ansatz: 500 ml)

Ponceau S	1 g	0,2% (w/v)
Trichloressigsäure	15 g	3% (w/v)
Aqua bidest.	ad 500 ml	

Primärantikörper-Lösung

- Anti-iNOS: Verdünnung 1 : 2000

Anti-iNOS-Antikörper	4 µl
0,5% Blocking-Lösung	8 ml

- Anti-Arginase I: Verdünnung 1 : 1000

Anti-Arginase I-Antikörper	8 µl
0,5% Blocking-Lösung	8 ml

- Anti-α-Tubulin: Verdünnung 1 : 1000

Anti-Human α-Tubulin-Antikörper	8 µl
0,5% Blocking-Lösung	8 ml

Probenpuffer (Ansatz: 10 ml)

Ficoll 400	1,5 g	15% (w/v)
1% (w/v) Bromphenolblau-Lösung	2,5 ml	0,25% (w/v)

5 x TBE	1 ml
Aqua bidest.	ad 10 ml

Reagenz AS (Ansatz: nach Bedarf für n Proben)

Reagenz S	n x 2 µl	2% (v/v)
Reagenz A	n x 100 µl	

RNAse-Inhibitor (10U µl⁻¹) (Ansatz: nach Bedarf)

RNAse-Inhibitor 40U µl ⁻¹	1 Teil
1 x RT-Puffer	4 Teile

RT-Master-Mix (Ansatz: je nach Probenzahl n für (n+1) Proben)

10 x RT-Puffer	n+1 x 2 µl
5 mM dNTP-Mix	n+1 x 2 µl
Oligo(dT) ₁₈ Primer-Lösung	n+1 x 2 µl
RNAse Inhibitor (10U µl ⁻¹)	n+1 x 1 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	n+1 x 1 µl

1 x RT-Puffer (Ansatz: nach Bedarf)

10 x RT-Puffer	1 Teil
RNAse freies Wasser	10 Teile

Säuremix (Ansatz: 275 ml)

konz. H ₂ SO ₄	25 ml	1 Teil
85% H ₃ PO ₄	75 ml	3 Teile
Aqua bidest.	175 ml	7 Teile

Sekundärantikörper-Lösung

- Goat Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate:

Verdünnung 1 : 3000

Anti-Rabbit IgG HRP	3 µl
0,5% Blocking Lösung	8 ml

- Goat Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase Conjugate:

Verdünnung 1 : 2000

Anti-Mouse IgG HRP:	4 µl
0,5% Blocking Lösung	8 ml

0,5 x TBE-Puffer (Ansatz: 1000 ml)

5 x TBE-Puffer	100 ml
Aqua bidest.	900 ml

5 x TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Puffer (Ansatz: 1000 ml)

Tris	54,9 g	0,5 M
Borsäure	27,5 g	0,5 M
EDTA	4,65 g	12,5 mM
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

TBS-Lösung (Tris buffered saline) pH 7,5 (Ansatz: 2000 ml)

Tris	12,1 g	50 mM
NaCl	17,52	150 mM
HCl	q.s.	
Aqua bidest.	ad 2000 ml	

TBST (TBS + Tween 20) (Ansatz: 1000 ml)

Tween 20	1 ml	0,1 (v/v)
TBS	1000 ml	

Transferpuffer (Ansatz: 2000 ml)

Tris	3,03 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
techn. Methanol	200 ml	20% (v/v)
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

500 mM Tris-HCl-Lösung (Ansatz: 10 ml)

Tris-HCl	787,8 mg
Aqua bidest.	ad 10 ml

100 mM Tris-HCl-Lösung pH 7,5 (Ansatz: 10 ml)

Tris	1,211 g	100 mM
- mit 10% HCl-Lösung pH 7,5 einstellen		
Aqua bidest.	ad 10 ml	

25 mM Tris-HCl pH 9,7 (Ansatz : 250 ml)

Tris	757 mg	25 mM
HCl	q.s.	
Aqua bidest.	ad 250 ml	

25 mM Tris-HCl / 5 mM MnCl₂-Lösung pH 7,4 (Ansatz: 100 ml)

500 mM Tris-HCl-Lösung	5 ml	25 mM
500 mM MnCl ₂ x 2H ₂ O-Lösung	1 ml	5 mM
Aqua bidest.	80 ml	
-mit 2,5 M NaOH-Lösung pH 7,4 einstellen		
Aqua bidest.	ad 250 ml	

1% Tris-Triton-Lösung

1 M Tris-HCl-Lösung pH 7,4	50 ml	100 mM
Triton x 100	5 ml	1% (v/v)
Aqua bidest.	ad 500 ml	

0,1% Triton x 100-Lösung (Ansatz: 1000 ml)

Triton x 100	1 ml	
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren (Ansatz: nach Bedarf; exemplarisch 10 ml)

0,1% Triton x 100	9144 µl
100 mM PMSF-Lösung	100 µl
0,1 M EDTA-Lösung pH 8	200 µl
125 µg ml ⁻¹ Pepstatin A-Lösung	56 µl
10 µg ml ⁻¹ Leupeptin-Lösung	500 µl

Triton-Tris-Mn-Lösung (Ansatz: 2 ml)

Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren	1 ml	0,05% (Triton)
25 mM Tris-HCl / 5 mM MnCl ₂ -Lösung	1 ml	12,5 / 2,5 mM
pH 7,4		

0,15% Trypanblau-Färbelösung (Ansatz: 8 ml)

0,4% Trypan Blue Stain	3 ml	0,15% (w/v)
1 x PBS-Puffer	5 ml	

I.3. Antikörper und Primer**PRIMÄRANTIKÖRPER****Anti-Arginase I**

polyklonaler Anti-Ratte Arginase I-Antikörper aus dem Kaninchen gegen die Sequenz:
H₂N-CEGNHKKPETDYLKPPK-COOH

Prof. Pfeilschifter
Dr. rer. nat. K.-F. Beck
Universität Frankfurt
Chargennr.: 5226

Anti-iNOS

polyklonaler Anti-Maus iNOS-Antikörper aus dem Kaninchen

Calbiochem
Chargennr.: 482728

Anti- α -Tubulin

monoklonaler Anti-Human α -Tubulin-Antikörper aus der Maus

Cedarlane
Chargennr.: 9002

SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Goat Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate

Santa-Cruz

Goat Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase Conjugate

Santa Cruz
Chargennr.: 2005

PRIMER**r (rat)- β -Actin**

sense: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC- 3'
 antisense: 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG- 3'

MWG

r (rat)-Arginase I

sense: 5'-TGGATGCTCACACTGACATC- 3'
 antisense: 5'-TCTGTGATGTAGAGACCTTC- 3'

MWG
(Acces.-Nr. J02720)**r (rat)-Arginase II**

sense: 5'-TTAGTAGAGCTGTGTTCAGGTGGC- 3'
 antisense: 5'-ACTTGAAGCAATCACATCCACTGC- 3'

MWG
(Acces.-Nr. U90887)**r (rat)-iNOS**

sense: 5'-CATGAACTCCAAGAGTTTCACCAG- 3'
 antisense: 5'-GCCCAGGTCGATGCACAACCTGG-3'

MWG
(Acces.-Nr. L12562)**r (rat)-Phosphatase 1 α**

sense: 5'-AACGAGATCCGTGGTCTTTG- 3'
 antisense: 5'-GGTCAGACCACAGCAGATCA- 3'

MWG
(Acces.-Nr. BC070517)**r (rat)-Phosphatase 1 β**

sense: 5'-TGGAGGTTTTCCACCAGAAG- 3'
 antisense: 5'-GCAGATATTTGGCGGAGAAA- 3'

MWG
(Acces.-Nr. XR008515)**r (rat)-Phosphatase 1 γ**

sense: 5'-TTTGAATACGGTGGCTTTCC- 3'
 antisense: 5'-CCACCTGATGGGCTCTACAT- 3'

MWG
(Acces.-Nr. BC078825)**r (rat)-Phosphatase 2**

sense: 5'-TGGAAAATCACCAGACACCA- 3'
 antisense: 5'-GTCCAAATGTGTAGCCAGCA- 3'

MWG
(Acces.-Nr. BC070914)**I.4. Arbeitsgeräte**

Analysenwaage
 Autoklav

2444, *Satorius*
 80230, *Webeco*

Bio-Ice Kühleinheit
 Brutschrank

Bio-Rad
Forma Scientific

Elektrophoresekammer

Model B2, *Owl Scientific Inc.*

Fotometer

DU-64, *Beckman*

Gelelektrophorese- bzw. Blotting-Kammer	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell mit Mini Protean II Cell, <i>Bio-Rad</i>
Heizrührer Mikroskop	IKA-Combimag RCH/T, <i>IKA</i> IMT2-RFL, <i>Olympus</i>
Thermocycler Thermostat Transilluminator	Hybaid Thermal Reactor, <i>MWG</i> <i>Julabo</i> <i>MWG</i>
Video-Dokumentationssystem	DocuGel V, <i>MWG</i>
Zentrifugen	5804R Kühlzentrifuge, 5415C, 5402, <i>Eppendorf</i> Biofuge pico, <i>Heraeus</i> Labofuge GL, <i>Heraeus</i> L7-55 Ultrazentrifuge (Rotor 50Ti, r=80,8 cm), <i>Beckman</i>

II.METHODEN

II.1. ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON MAKROPHAGEN AUS DER RATTENLUNGE

Zur Gewinnung der Alveolarmakrophagen wurden zwei bis vier Monate alte, im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn gezüchtete Sprague-Dawley-Ratten, beiderlei Geschlechtes herangezogen. Als gewöhnlicher Richtwert bzgl. der pro Versuch benötigten Anzahl von Ratten erwies sich erfahrungsgemäß eine Anzahl von vier bis fünf Ratten. Um eine möglichst hohe Ausbeute an vitalen Alveolarmakrophagen zu gewährleisten, ist eine schonende Tötung der Tiere erforderlich, da ihre Lungen unter Stressbedingungen zu Einblutungen neigen, und die daraufhin gewonnene Zellsuspension einen hohen Anteil an Erythrozyten besitzt. Die Ratten wurden zunächst durch einen Schlag ins Genick zu betäubt und anschließend unterhalb des Foramen occipitale ihr Rückenmark durchtrennt. Nach

Öffnung des Thorax werden Lunge samt anhängender Trachea vorsichtig herauspräpariert.

Zwecks Lungenlavage als Methode der Zellisolierung, wurden die Lungen mit Hilfe einer sterilen Spritze und steriler, zur Verbesserung der Adhäsion der Makrophagen, 4°C kalter PBS-Lösung, gespült. Dabei sollte eine Überdehnung der Lunge zur Verhinderung von Gefäßrupturen möglichst vermieden werden. Der rasch durchzuführende Vorgang wurde zur Erfassung möglichst vieler Zellen pro Lungenpaar drei Mal wiederholt, und die Lavageflüssigkeit wurde daraufhin in sterile 13-ml-Kunststoffröhrchen überführt, um anschließend bei 2500U/min für 5 min zentrifugiert zu werden. Der resultierende Überstand wurde unter sterilen Bedingungen dekantiert, und das auf dem Grund verbliebene Zellsediment mit 6 ml 4°C kalter, steriler PBS nacheinander in allen Röhrchen resuspendiert und in einem neuen sterilen Kunststoffröhrchen gesammelt. Die fünfminütige Zentrifugation bei einer Umdrehungszahl von 2500U/min wurde wiederholt, der Überstand erneut verworfen, und das verbliebene Pellet in einer genau definierten Menge 37°C warmen Makrophagen-Primärmediums aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer, nachdem 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Färbelösung zur anschließenden lichtmikroskopischen Darstellung miteinander gemischt wurden. Bei der Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop wurde die Zellvitalität stets nach denselben morphologischen Kriterien geschätzt, und bei der Zellzählung nur die vitalen Zellen berücksichtigt. Zusätzlich wurde überprüft, ob in jedem neuen Einzelversuch ein ähnlich vernachlässigbar kleiner Anteil von Erythrozyten vorlag.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde unter Berücksichtigung des Suspensionsvolumens und der gewünschten Zellaussaat von einer Million Zellen pro Well die entsprechende Aussaat in 12-Well-Kulturschalen durchgeführt, gefolgt von der Zugabe jeweils 1 ml warmen Makrophagen-Primärmediums. Zur Adhärenz wurden die ausgesäten Zellen 2 h lang bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte der Mediumwechsel. Unter Zuhilfenahme eines schwach eingestellten Sauggeräts wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und somit die adhärennten Zellen von den abgelösten selektiert, woraufhin erneut warmes Makrophagen-Primärmedium zugesetzt wurde. Je nach

Versuchsanordnung schloss sich die Applikation unterschiedlicher Testsubstanzen an, und die Kultivierung wurde für eine definierte Zeit fortgesetzt.

II.2. SPEKTRALFOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NITRIT

Nach beendeter Inkubationszeit der isolierten Alveolarmakrophagen wurden 400 µl des Kulturmediums entnommen und für die Nitritbestimmung, basierend auf der Griess-Reaktion, eingesetzt. Sowohl die Proben als auch die Standards erhielten 400 µl frisch hergestelltes Griess-Reagenz, welches ein Gemisch aus Sulfanilsäure und N-(1-Naphthyl)ethyldiamin war. Letzteres reagierte mit NO zu einem spektralfotometrisch erfassbaren Produkt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die jeweiligen Extinktionen gegen einen Leerwert, bestehend aus 400 µl Makrophagen-Primärmedium und 400 µl Griess-Reagenz, bei einer Wellenlänge von 540 nm spektralfotometrisch bestimmt. Anhand der Absorptionswerte der NaNO₂-haltigen Standards wurde eine Regressionsgerade erstellt und deren Steigung zur Ermittlung der Nitritkonzentration in den Mediumproben herangezogen. Die Konzentrationen der Standards betragen 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 µM NaNO₂. Als Verdünnungsmittel diente aus Gründen der Vergleichbarkeit Makrophagen-Primärmedium.

II.3. ARGINASE-ASSAY

In diesem Assay diente die Entstehung vom Produkt Harnstoff als Maß für die Aktivität der verantwortlichen Enzyme –der Arginasen.

Der Kulturüberstand in den 12er-Wells, wurde mit einem schwachen Sauger schonend entfernt, und den einzelnen Zellkulturen jeweils 750 µl 0,1% Triton x 100-Lösung inklusive Proteaseinhibitoren zwecks Zellablösung zugesetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, nach deren Abschluss 500 µl des Zelllysats für die Harnstoffbestimmung und 50 µl für die Proteinbestimmung, welche an anderer Stelle beschrieben ist, eingesetzt wurden. Das Zelllysate wurde in

Glasröhrchen mit 500 µl 25 mM Tris-HCl/ 5 mM MnCl₂ pH 7,4 versetzt und, mit Glasstopfen verschlossen, ins Wasserbad für eine Präinkubation von 10 min bei 56°C zur Aktivierung der Arginase platziert. Mangan fungierte im Assay -wie auch in vivo- als Co-Faktor des Arginase-Enzyms. Im Anschluss an die Vorbehandlung erfolgte die Substratgabe zur Initiation des eigentlichen Enzym-Assays, indem jeweils 50 l aktiviertes Lysat in 13-ml-Kunststoffröhrchen überführt und mit 50 µl 0,5 M L-Arginin-Lösung versehen wurde. Durch kurze Zentrifugation bei 1500 U/min sammelte sich das Reaktionsgemisch am Röhrchenboden. Zugeschraubt wurden die Röhrchen für 60 min ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Die Inkubationszeit wurde zur Zubereitung von Harnstoff-Standards für die später benötigte Eichreihe genutzt. 50 mg Harnstoff gelöst in 10 ml destilliertem Wasser wurde mittels Triton X 100/ Tris-HCl/ MnCl₂-Lösung 1:10 verdünnt und für die Erstellung der Standardreihe mit Konzentrationen von 1, 2, 5, 10, 15, 20 und 25 µg Harnstoff pro 100 µl Endvolumen verwendet. Der Leerwert wurde in vergleichbarer Zusammensetzung mit obigen Lösungen unter Auslassen der Harnstoffapplikation vorbereitet.

Nach Ablauf der einstündigen Umsatzzeit wurde die Unterbindung der Harnstoffsynthese mittels Zugabe von 800 µl enzymdenaturierendem Säuremix eingeleitet und zur Komplexierung des angereicherten Harnstoffes jeweils 50 µl 9% ISPF-Lösung hinzugefügt. Zur Initiation der Farbstoffbildung aus der Reaktion des Harnstoffs und der 9% ISPF-Lösung wurden die Proben für weitere 45 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Die spektralfotometrische Bestimmung erfolgte bei 540 nm.

In die Berechnung der Harnstoffkonzentration wurde die Steigung der aus den Extinktionswerten der Standards erstellten Regressionsgeraden einbezogen. Bei der Umrechnung in Arginase-Einheiten wurde der Proteingehalt der entsprechenden Proben mitberücksichtigt. Eine Arginase-Einheit (U) ist als die Enzymmenge definiert, die die Entstehung von 1 µmol Harnstoff pro min unter gegebenen Bedingungen katalysiert.

II.4. PROTEINBESTIMMUNG MIT DEM DC PROTEIN-ASSAY

Je 50 μl des Zelllysats aus dem Arginase-Assay wurden, welches 0,1% Tris-Triton und Protease-Inhibitoren enthielt, für die Proteinbestimmung verwendet. Jeweils 100 μl Arbeitsreagenz AS, zusammengestellt aus den Lösungskomponenten A und S im Verhältnis 100 : 1, und 800 μl der Lösung B wurden zu den einzelnen Proben und zu den Protein-Standards aufsteigender Konzentration hinzugefügt. Die Proteinstandards enthielten in 0,1% Tris-Triton gelöstes BSA in den Endkonzentrationen von 50, 100, 300, 700, 1100 und 1500 $\mu\text{g/ml}$. Analog zu den Proben und Standards verfuhr man mit dem identisch vorbereiteten Leerwert aus 50 μl der Tris-Triton-Lösung mit Protease-Inhibitoren und ließ sie zusammen 15 min bei Raumtemperatur inkubieren. Die spektralfotometrische Bestimmung erfolgte bei 750 nm. Anhand der resultierenden Regressionsgeraden ließ sich der in den Proben befindliche Proteingehalt berechnen.

II.5. MTT-VITALITÄTSASSAY

Die Vitalität einer Zelle ist am aussagekräftigsten anhand ihres spezifischen oder unspezifischen Zellstoffwechsels beurteilbar. Eine Zelle, die lebt, ist metabolisch aktiv, ablesbar an den anfallenden Metabolisierungsprodukten. Im vorliegenden Fall diente die an die Atmungskette gekoppelte Umwandlung von MTT zu MTT-Formazan als Indiz für die Zellvitalität. Ausgesät wurden nach Protokoll jeweils 1 Mio frisch isolierte Primärmakrophagen aus der Rattenlunge in 12-Multiwell-Schalen mit Primärmedium inklusive 10%igem FKS. Es folgte eine zweistündige Adhäsionsperiode bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Kulturmedium mit Hilfe einer schwach eingestellten Saugpumpe abgesaugt und daraufhin 1 ml frisches Medium erneut zugegeben. Zusätzlich erfolgte der Zusatz von Testsubstanzen in entsprechender Konzentration, welche für eine zwanzigstündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ auf den Zellen belassen wurden. Im Anschluss an die Einwirkzeit der Testsubstanzen wurde pro Well 5 μl 50 mg ml⁻¹ MTT zu dem Medium-Testsubstanz-Gemisch hinzugefügt und die Zellkulturen für die Reaktion von MTT zu MTT-Formazan für 2 h in den

Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelegt. Nach Beendigung der zweistündigen Umsatzzeit wurde der Kulturüberstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei 14 000 U min⁻¹ und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das am Boden gesammelte Pellet wurde dann in 500 µl DMSO und 5% (v/v) HCl aufgenommen und in das entsprechende Well überführt. Nach intensivem Auf- und Abpipettieren, zwecks Lyse der adhärenen Zellen und Auflösung der MTT-Formazan-Kristalle, wurde das Lysat in eine Halbmikroküvette überführt und dessen Absorption anschließend am Spektralphotometer bei 550 nM gegen den aus 500 µl DMSO und 5% (v/v) HCl bestehenden Leerwert vermessen. Die für die Konzentrationsbestimmung von MTT-Formazan notwendige Eichgerade enthielt in DMSO und 5% (v/v) HCl verdünntes Formazan in den Endkonzentrationen von 1, 3, 6, 10, 30, 30, 60, 100, 300 mg/ml. Mit Hilfe der Regressionsgeraden wurde die Konzentration von MTT-Formazan in der jeweiligen Probe berechnet.

II.6. RNA-PRÄPARATION AUS ALVEOLARMAKROPHAGEN DER RATTE

Für die RNA-Extraktion aus Alveolarmakrophagen der Ratte wurden jeweils sieben Millionen Primärzellen in 35 mm-Petrischalen ausgesät und nach zweistündiger Adhärenzphase und erfolgtem Mediumwechsel unter dem Zusatz von Testsubstanzen 20 h lang bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Zur Vorbereitung der RNA-Extraktion wurden 17,5 µl β-Mercaptoethanol zu der Lysis-Lösung 1 von Eppendorf und 48 ml 95% Ethanol zu dem Waschkonzentrat 2 pipettiert. Die Kühlzentrifuge sollte auf 4°C vorgekühlt sein. Nach Ablauf der Inkubationszeit der Zellkulturen wurde das Medium mit einem Sauginstrument vorsichtig abgesaugt und daraufhin 300 µl der vorbereiteten Lysis-Lösung in jede 35 mm-Schale hinzugefügt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde das resultierende Zelllysate in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Es schloss sich eine fünfminütige Zentrifugation bei 16000 x g an. Der entstandene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gebracht, unter Beachtung, dass keine festen Bestandteile mit abgenommen wurden. Daraufhin wurden 300 µl 70% Ethanol zu dem Überstand hinzugefügt und das Gemisch durch vorsichtiges Kippen gleichmäßig verteilt, wobei sich bisweilen ein feiner Niederschlag als Zeichen des RNA-Präzipitats bildete. 200 µl gut gemischte Perfect RNA Binding Matrix-Lösung ergänzte das

Lysat-Ethanol-Gemisch, welches in eine Perfect RNA Mini Spin Column gleichmäßig einpipettiert und 60 s bei 16000 x g zentrifugiert wurde. Nachdem das Filtrat verworfen und die Spin Column in das gleiche Eppendorf-Gefäß zurückplatziert wurde, fügte man 700 µl der Waschlösung 1 hinzu und wiederholte die Zentrifugation bei 16000 x g für 30 s, um die Reste der Waschlösung 1 zu entfernen. Das Filtrat wurde erneut verworfen und das Spin Column diesmal in ein Sammler-Gefäß überführt, um die RNA mit 500 µl Waschlösung 2 unter fünfzehnssekündiger Zentrifugation zu waschen. Das Filtrat wurde dekantiert und die Spin Column in dasselbe Sammler-Gefäß eingeführt. Die dreißigsekündige Zentrifugation bei 16000 x g wurde ein zweites Mal wiederholt, um die Reste der zweiten Waschlösung zu entfernen. Anschließend wurde die Spin Column in ein neues Gefäß überführt, um die RNA zu eluieren, indem 50 µl Molecular Biology Wasser direkt auf die „Binding Matrix“ pipettiert wurden. Nach einsekündiger schonender Durchmischung mittels des Vortexers wurden die Gefäße im Schwimmkissen 5 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert und anschließend, zunächst für 5 s erneut gevortext, und dann 2 min bei 16000 x g zentrifugiert, um das Kondenswasser am Gefäßboden zu sammeln. Danach wurden sie entweder sofort auf Eis zwecks Weiterverarbeitung gestellt oder bei -80°C eingefroren. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der Probe mit 78 µl DEPC-Wasser verdünnt (Verhältnis 1:40) und mit Hilfe des Fotometers vermessen, wobei die Konzentration der RNA in µg ml⁻¹ direkt abgelesen werden konnte. Der RNA-Konzentrationsbestimmung liegt zugrunde, dass bei einer Wellenlänge von 260 nm ein OD-Wert von 1 einer Konzentration von 40 µg ml⁻¹ entspricht.

II.7. REVERSE TRANSKRIPTION

Aufgrund der Labilität der einsträngigen RNA war bei der Durchführung der Reversen Transkription besondere Sorge zu tragen, dass alle RNA-haltigen Gefäße stets auf Eis gestellt werden, sowie dass für sämtliche Pipettierschritte sterile, gestopfte Pipetten eingesetzt werden. Zunächst wurde das für ein Endvolumen von 20 µl ausgerechnete Volumen RNase-freien Wassers in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Im zweiten Schritt wurde der unten im Detail beschriebene RT-Master-Mix angesetzt, wobei man sich nach n+1 Proben orientierte zur Kompensation des an

den Pipettenspitzen verbliebenen Totvolumens. Es wurden jeweils 8 µl Master-Mix zum Wasser hinzugefügt. Aus den am Fotometer gewonnenen Angaben über die RNA-Konzentration in den einzelnen Proben ließ sich mit dem Dreisatz diejenige Flüssigkeitsmenge der Probe errechnen, welche 1 µg RNA enthielte. Anschließend wurden die Proben nicht mehr als 5 s bei schwacher Einstellung des Rüttlers aufgerüttelt und daraufhin im Thermocycler 60 min bei 37°C zum Erhalt der zweisträngigen cDNA inkubiert. Nach kurzer Inkubation bei 93°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Beendigung der Reaktion erfolgte eine kurze Zentrifugation, damit am Deckel haftende Kondenströpfchen sich wieder am Gefäßboden vereinigen. Die Proben wurden mit jeweils 80 µl sterilem Wasser aufgefüllt und bis zum Einsatz in der PCR bei –20°C eingefroren.

Master-Mix

<u>Bestandteil</u>	<u>Volumen</u>
10 x RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl
Oligo(dt) ₁₈ Primer (10 µM)	1 µl
Omniscript RT	1 µl

II.8. POLYMERASE-KETTENREAKTION UND AGAROSEGEL -ELEKTROPHORESE

Polymerase-Kettenreaktion

Die benötigten Lösungen für den Master-Mix und der cDNA-Pool wurden nach dem Auftauen stets auf Eis gehalten. Die Taq Polymerase wird ohne vorheriges Auftauen unverzüglich auf Eis gestellt. Zunächst wurde der Master-Mix aus untenstehenden Komponenten in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß für n + 1 Proben zusammengesetzt. Die PCR selbst wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden 32 µl steriles Wasser vorgelegt, in die dann je 2 x 2,5 µl des entsprechenden Primerpaares pipettiert wurden. Diesem Gemisch fügte man anschließend 5 µl der zu untersuchenden cDNA hinzu. Vor dem Einsetzen in den

Thermocycler wurde jede Probe zusätzlich mit 60 µl Mineralöl überschichtet, um größere Verdunstungsverluste zu vermeiden. Für β -Aktin, iNOS, Arginase I und Arginase II wurde folgendes PCR-Programm am Thermocycler durchgeführt:

<u>Funktion</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
Denaturierung	94	3 min einmalig
	94	je Zyklus 45 s
Annealing	56	je Zyklus 30 s
Polymerisation	72	je Zyklus 1 min
	72	10 min einmalig

Für die Phosphatasen PP 1 α , PP 1 β , PP 1 γ und PP 2 betrug die Annealing-Temperatur 55°C. Die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen betrug für die β -Aktin-, iNOS-, Arginase I- und Phosphatasen-Primerpaare stets 25, für das Arginase II-Primerpaar stets 35. Nach Durchführung der PCR wurden die Proben bis zur Verarbeitung am folgenden Tag bei 4°C im Kühlschrank gehalten.

Master-Mix

<u>Bestandteil</u>	<u>Volumen</u>
10 X PCR-Puffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	1,5 µl
10 mM dNTPS	1 µl
evtl. DMSO	2,5 µl (5% des Endvolumens)
5 U µl ⁻¹ Taq Polymerase	0,5 µl

Agarosegel-Elektrophorese

Das gegossene und erkaltete Gel wurde zunächst in die Elektrophorese-Kammer gelegt, welche mit 0,5 x TBE gefüllt wurde, so daß das Gel vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Die PCR-Proben wurden aus dem Tiefkühlschrank geholt und unverzüglich weiterverarbeitet, indem die frühzeitig zu schmelzen beginnende Fettphase des Mineralöls mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe von der noch festen wässrigen Phase der PCR-Probe entfernt wurde. Anschließend entnahm man 40 µl jeder PCR-Probe und überführte sie in ein neues, steriles 0,5 ml Gefäß. Es folgte das

Beimischen von 4,4 μ l Probenpuffer zu den einzelnen Proben, bevor jeweils 40 μ l einer jeden Probe auf das Gel aufgetragen wurden. Als DNA-Molekulargewichtsstandard, sog. DNA-Leiter, wurden 10 μ l Smart-Ladder in eine der äußeren Geltaschen pipettiert. Bei konstanter Stromstärke von 60 mA wurde die elektrophoretische Auftrennung so lange fortgesetzt, bis der farbstoffhaltige Probenpuffer die Unterkante des Gels erreicht hatte. Die unterschiedliche Raumstruktur und Anzahl von Basenpaaren bedingte auch eine andere Laufgeschwindigkeit der unterschiedlichen DNA-Stränge, was in einem entsprechend unterschiedlichen Bandenmuster an höherer oder tiefer gelegenen Stelle im Gel resultierte. Das Gel wurde nun vom Träger genommen und zur Sichtbarmachung der aberranten Banden mit UV-Licht belichtet. Mit einer Videokamera konnte man die Bilder zwecks Dokumentation aufnehmen und zur späteren semiquantitativen Analyse mit Hilfe der RFLP-scan-Software auf Diskette speichern. Mit Hilfe dieses Programms wurden Quotienten aus den optischen Dichten der Probenbanden und der entsprechenden Referenzbanden des β -Aktins gebildet.

II.9. PROTEINPRÄPARATION AUS ALVEOLARMAKROPHAGEN FÜR EINEN ANSCHLIESSENDEN WESTERN-BLOT

Proteinextraktion

Am Ende der Makrophagenkultur wurde das Medium schonend abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml 37°C warmer Proteaseinhibitoren-haltiger PBS-Lösung vorsichtig abgewaschen. Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers und 1 ml 4°C kalter PBS-PI-Lösung wurde der zurückgebliebene Zellrasen schließlich vom Boden abgelöst. Nach Überführung der Zell-Suspension in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße wurde der Waschvorgang mit 500 μ l PBS-PI-Lösung wiederholt und mit der ersten Zellsuspension vereinigt. Von diesem Schritt an wurden alle Reaktionsgefäße, die proteinhaltige Flüssigkeiten enthielten, zum Schutz vor Protease-Aktivität im Eisbad gekühlt. Es folgte die Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 6000 U/min und 4°C. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Makrophagen-Pellet in 50 μ l NP-40 Puffer mit Proteaseinhibitoren gut resuspendiert. Mit Hilfe des Detergens bezweckte man die Lyse aller Zellen bis auf den Zellkern. Durch eine anschließende

zehnminütige Zentrifugation bei 6 000 U/min und 4°C wurden schließlich die Kernbestandteile von den Zellresten abgetrennt. Die Überstände mit den Zellresten wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Falls nicht sofort mit der Proteinbestimmung fortgefahren wurde, erfolgte die Lagerung der Proben bei -20°C.

Proteinbestimmung

Um eine höhere Messgenauigkeit der Konzentration zu erreichen, wurde bei der Proteinbestimmung für einen Western-Blot eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 2 x 5 µl Makrophagen-Proteinlösung eingesetzt und mit 0,1% Tris-Triton auf jeweils 500 µl aufgefüllt um mit dem DC-Protein-Assay bestimmt zu werden. Die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel für Standards und Proben hatten keinerlei Einfluss auf die Ergebnisse.

Vorbereitung der Proben für den Western-Blot

Im Anschluss an die Proteinbestimmung konnten die auf Eis gestellten Proben gegebenenfalls mit Roti-Load-Probenpuffer verdünnt werden, so dass die Proteinmenge in einem Endvolumen von 10 –15 µl enthalten war, um mit dem eingesetzten Antikörper ein möglichst optimales Ergebnis zu liefern. Zuerst wurde das berechnete Probevolumen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt und anschließend der Roti-Load-Probenpuffer (entspricht ca. ½ des Probenvolumens) hinzupipetiert und resuspendiert. Es folgte eine zweiminütige Denaturierungsphase im kochenden Wasserbad. Nach einer kurzen Zentrifugation, um die Protein-Puffer-Lösung am Boden der Reaktionsgefäße zu sammeln, wurden die Proben mit Hilfe von Kapillarspritzen in die Geltaschen gefüllt. Als Proteingrößenstandard dienten 5 µl Kaleidoscope-Marker, welcher in der Regel auf eine der beiden äußeren Bahnen aufgetragen wurde.

Durchführung der Protein-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteingemische ging man nach dem Prinzip der Polyacrylamidgel-Elektrophorese vor. Die von uns verwendeten „Ready-Gels“ (Precast Gel for Polyacrylamide Elektrophoresis), sowie die entsprechende

Gelelektrophorese- bzw. Blotting-Kammer „Mini Protean II Cell-System“, wurden von der Firma Bio-Rad bezogen. Ergänzend wurde die „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“, ebenfalls von Bio-Rad, für das Immunoblotting benutzt. Es war sowohl die Bearbeitung eines als auch zweier Protein-Gele möglich. Die Gelelektrophorese mit Ready-Gels wurde bei 200 V und 60 mA bei einem Gel bzw. 120 mA bei zwei Gelen durchgeführt. Nach ca. 70 min erreichte der in Roti-Load enthaltene Blaumarker den unteren Rand des Gels. Die Elektrophorese wurde sodann beendet, die Apparatur abgebaut und das Trenngel mit einem Skalpell vorsichtig von der Sammelgelschicht getrennt, um 5 min in einer Petrischale mit Transferpuffer zur Entfernung von anhaftenden Salzen und Detergentien gewaschen zu werden.

Immunoblot

Bereits während der Gelelektrophorese wurde eine auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran zurechtgeschnitten und für die Proteinübertragung vorbereitet, indem sie zunächst 1-3 s mit Methanol befeuchtet, daraufhin 1-2 min mit Aqua bidest. ausgewaschen und abschließend zur Equilibrierung für 20 min in Transferpuffer gewässert wurde. Sämtliche Komponenten der Western-Blot-Apparatur sollten vor dem Gebrauch gründlich mit bidest. Wasser gesäubert werden, um Rückstände des Gelelektrophoresepuffers zu entfernen. Die Filterpapiere und die Schwämme wurden vor dem Einbau in die Blotting-Kammer in Transferpuffer getränkt.

Kurz vor dem Start des Blotting-Vorgangs wurden die „Mini Tras Blot-Elektrode“ und die Bio-Ice Kühleinheit von Bio-Rad in die Pufferkammer gehängt und auf einen Magnetrührer gestellt. Unter Berücksichtigung der Richtung des im Blotvorgangs fließenden Stroms wurde die Membran luftblasenfrei auf das Protein-Gel gelegt und zusammen zwischen je zwei Filterpapieren und Schwämmen in einer Gelhalterungskassette fixiert. Diese wurde anschließend in die Trans-Blot Elektrode geschoben und die Pufferkammer mit auf 4 °C gekühltem Transferpuffer gefüllt. Der Vorgang der Proteinübertragung erfolgte 90 min lang unter Rühren bei konstanter Spannung von 100 V und einer Stromstärke von ca. 250 mA. Anschließend wurde die Stromzufuhr unterbunden, die Gelhalterungskassette aus der Apparatur genommen und die Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine

Petrischale überführt.

Detektion

Zur Detektion wurde die Membran zunächst auf einem Taumler mit 0,2% Ponceau-S-Lösung zur Darstellung der Proteinbanden angefärbt und mit Aqua bidest. nachgewaschen. Durch die Anfärbung der auf die Membran übertragenen Banden konnte an dieser Stelle der Erfolg des Transfervorgangs überprüft werden. Als nächstes erfolgte die Entfärbung der Membran mit bidest. Wasser und TBS-Lösung pH 7,5, worauf sich die einstündige Inkubation in 8 ml 1% Blocking-Lösung bei Raumtemperatur auf einem Taumler anschloss. Entfiel die Schaukelbewegung konnte alternativ über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Nach Abschluss der Inkubationsphase wurde die Membran nun dem in 8 ml 0,5% Blocking-Lösung gelösten Antikörper, ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumler, ausgesetzt. Es folgten je zwei zehnmündige Waschschrirte mit TBST-Lösung zum Abwaschen nicht gebundener Anteile des Primärantikörpers und 0,5% Blocking-Lösung zur Vorbereitung auf den Sekundärantikörper. Die Einwirkzeit des Sekundärantikörpers, ebenfalls in 0,5% Blocking-Lösung verdünnt, betrug 30 min bei Raumtemperatur auf dem Taumler, gefolgt von viermaligem Waschen von jeweils 15 min mit TBST-Lösung. Während des Waschprotokolls wurde die Detektionslösung für die Chemilumineszenz-Reaktion aus gekühlten Komponenten des „BM Chemilumineszenz-Kits“ angesetzt und die Verdünnungen der Fixier- und Entwickler-Lösungen für die Entwicklung des Röntgenfilms hergestellt.

Sowie der letzte Waschschrirte des Detektionsvorgangs beendet war, wurde die Membran ins Photolabor gebracht, wo die TBST-Lösung abgegossen und die mit Proteinen benetzte Membranseite für 60 s mit Detektionslösung benetzt wurde. Nach dem Abtropfen wurde die Membran möglichst luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit der Proteinseite nach oben in eine Filmkassette gelegt. Ein Röntgenfilm wurde bei Dunkelheit auf die erforderliche Größe zugeschnitten und für eine definierte Zeit auf die Membran gelegt. Anschließend wurde der Film für 3-5 min ins Entwicklerbad gelegt, kurz in Wasser getaucht und 3-5 min im Fixierbad belassen. Mit einem zweiten Film wurde die Belichtungsdauer der Chemilumineszenz optimiert. Die belichteten, entwickelten und fixierten Filme

wurden ca. 15 min gewässert, 45 min im Trockenschrank getrocknet und mit Hilfe eines Videodokumentationssystems auf Disketten abgespeichert. Mit dem RFLPscan-Programm konnten dann die optischen Dichten der Protein-Banden bestimmt und quantitativ ausgewertet werden.

II.10. STATISTIK UND BERECHNUNG

Excel 5.0: Sämtliche Auswertungen der Versuchsergebnisse wurden mit diesem Programm unter Erstellung von Tabellen der Einzelergebnisse und deren Verwendung für Mittelwerttabellen durchgeführt. Auch die Errechnung von Eichgeraden für die Harnstoff, Nitrit- und Proteinbestimmung erfolgte mit Excel 5.0. Während alle Daten aus dem Arginase-Assay auf Protein normalisiert wurden, wurde bei der Bestimmung der Nitrit-Akkumulation im Zell-Überstand auf eine Protein-Normalisierung verzichtet, da diese Methode die Ermittlung eines kumulativen Wertes darstellt, welcher durch einen Bezug auf die am Endpunkt der Inkubationszeit nach Entfernung des Kulturüberstandes bestimmte Proteinmenge verfälscht werden könnte.

GraphPad Prism 2.01: Dieses Programm wurde zur graphischen Darstellung der arithmetischen Mittelwerte der Versuchsergebnisse \pm SEM verwendet.

GraphPad Instat: Mit Hilfe dieses Programms wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Mittelwerten evaluiert. Verglichen wurden in der Regel Absolutwerte oder Prozente des Mittelwerts der Kontrollgruppe einer jeden Zell-Präparation. Falls nicht anders angegeben, erfolgte der Vergleich zweier Messreihen durch den Mann-Whitney U Test oder Wilcoxon matched-pairs signed ranksTest. Als signifikant galt dabei $p < 0,05$, als hoch signifikant $p < 0,01$ bzw. $p < 0,005$, und als höchst signifikant $p < 0,001$.

RFLPscan 2.01: Dieses Programm der Firma MWG Biotech wurde zur semiquantitativen Erfassung der optischen Dichten der über die Agarosegel-Elektrophorese erhaltenen PCR-Banden, bzw. der bei den Immunoblots sichtbar gewordenen Protein-Banden, verwendet.

D. ERGEBNISSE

I. AKTIVITÄT DER iNOS UND DER ARGINASE UNTER DER WIRKUNG VON LPS FÜR 20 H

I.1. Quantifizierung der iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von LPS für 20 h

Zur Erfassung der iNOS-Aktivität in den Alveolarmakrophagen der Ratte, wurde die Nitritproduktion der Zellen als Indikator für die NOS-Aktivität herangezogen, weil das in der Enzymreaktion neben L-Citrullin gebildete NO sich durch Oxidation rasch zu Nitrit formiert. Wie in der Abb. 1 im Säulendiagramm dargestellt, zeichnete sich bereits unter Kontrollbedingungen eine geringe schwankende basale Nitritproduktion ab. Die Anwesenheit von LPS verursachte in jedem Fall eine massive Zunahme der NO-Synthese um mehr als das Vierfache, statistisch gewertet als hoch signifikant (Abb. 1).

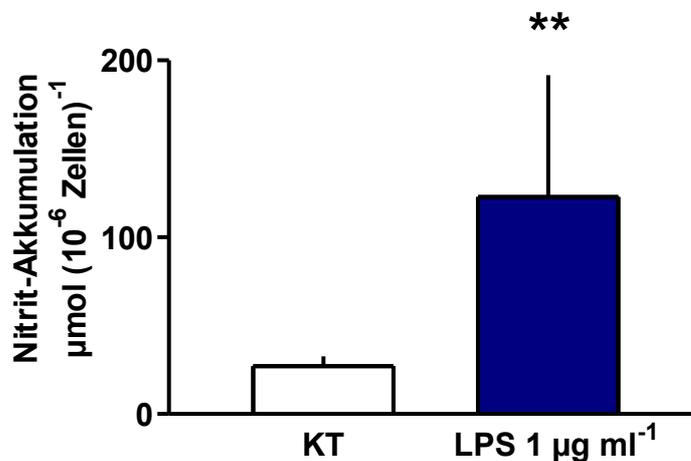


Abb. 1: Effekt von LPS auf die Nitrit-Konzentration im Kulturmedium von Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden einer zwanzigstündigen Inkubation mit bzw. ohne LPS kultiviert und anschließend die Nitritkonzentration im Kulturmedium bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte in $[\mu\text{mol (10}^6 \text{ Zellen)}^{-1}]$ + SEM von jeweils 10 Experimenten. Die Signifikanz des Unterschiedes verglichen mit der entsprechenden Kontrolle ist mit ** als $P < 0,005$ gekennzeichnet.

I.2. Quantifizierung der Arginasen-Aktivität unter dem Einfluss von LPS für 20 h

Die Messung der Arginase-Aktivität aus den Zelllysaten nach zwanzigstündiger Kultur mit LPS ergab einen tendenziellen Aktivitätsanstieg verglichen mit der Basalaktivität unter Kontrollbedingungen, dieser lag jedoch unterhalb des statistischen Signifikanzniveaus und gilt demnach als nicht signifikant (Abb. 2). Da die Wirkung von LPS als effektiver Induktor u.a. der Arginase in der Literatur etabliert ist (Klasen et al., 2001; Sonoki et al., 1997) und die von uns durchgeführten molekularbiologischen Methoden damit übereinstimmende Daten lieferten, ist die vorliegende Dateninkongruenz bzw. -divergenz mit großer Wahrscheinlichkeit durch die starke Streuung der einzelnen Versuchsergebnisse bedingt. Ein methodischer Fehler konnte nach systematischer Fehlersuche in diesem Fall nicht eruiert werden.

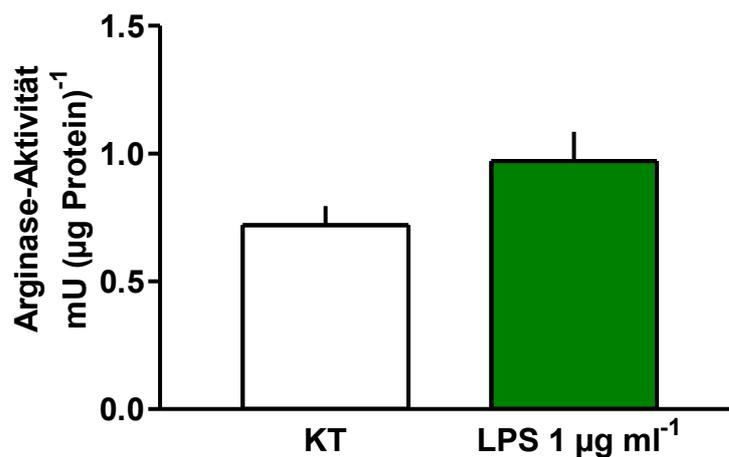


Abb. 2: Einfluss von LPS auf die Arginasen-Aktivität [mU (µg Protein)⁻¹] in Alveolarmakrophagen der Ratte nach zwanzigstündiger Inkubation in An- bzw. Abwesenheit von LPS (1 µg ml⁻¹). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von jeweils 6 unabhängigen Versuchen. Mit P=0.0625 liegt der Aktivitätsunterschied der LPS-behandelten Zellreihe knapp unterhalb des statistisch signifikanten Niveaus in Bezug auf die Kontrollkulturen.

II. AKTIVITÄT DER iNOS, ARGINASE I UND II UNTER DER WIRKUNG VON LPS FÜR 1 H

Die Versuchsschritte erfolgten nach demselben Protokoll wie für das zwanzigstündige Enzym-Assay mit einziger Änderung, dass die Inkubationszeit der Alveolarmakrophagen in Anwesenheit von LPS 1 h betrug.

II.1. Quantifizierung der Arginasen-Aktivität unter dem Einfluss von LPS für 1 h

Die verkürzte Einwirkzeit von LPS vermochte keinen signifikanten Anstieg der Substratumsatzrate der Arginase herbeizuführen (Abb. 3). Der Aktivitätsunterschied der LPS-Kulturen im Vergleich zu den Kontrollzellen lag deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus (Abb. 3).

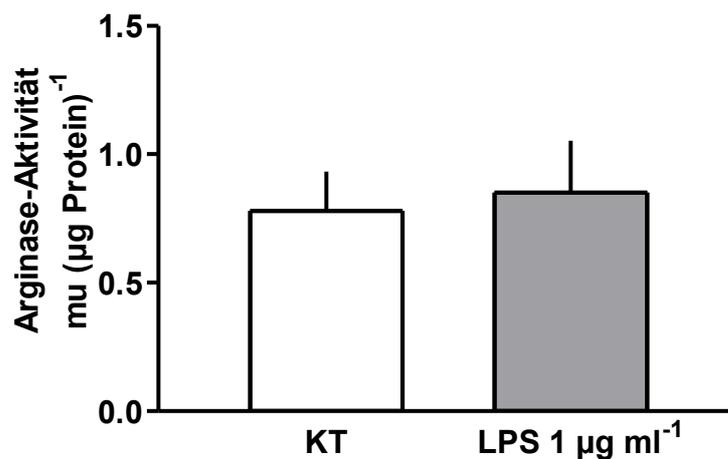


Abb. 3: Änderungen der Arginasen-Aktivität in [$\mu\text{U} (\mu\text{g Protein})^{-1}$] unter der einstündigen Wirkung von 1 μg LPS in Alveolarmakrophagen der Ratte. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von jeweils 7 unabhängigen Experimenten. Mit $P > 0,05$ ist der Unterschied der LPS-Zellpräparation bezogen auf die Kontrollkultur nicht signifikant.

II.2. iNOS-Aktivität unter einstündiger LPS-Wirkung

Bereits die einstündige Inkubation der Makrophagen in Anwesenheit von LPS verursachte eine statistisch signifikante Aktivitätserhöhung der iNOS im Vergleich zu

den unbehandelten Kontroll-Messreihen, gemessen an der Nitrit-Akkumulation im Kulturmedium (Abb. 4).

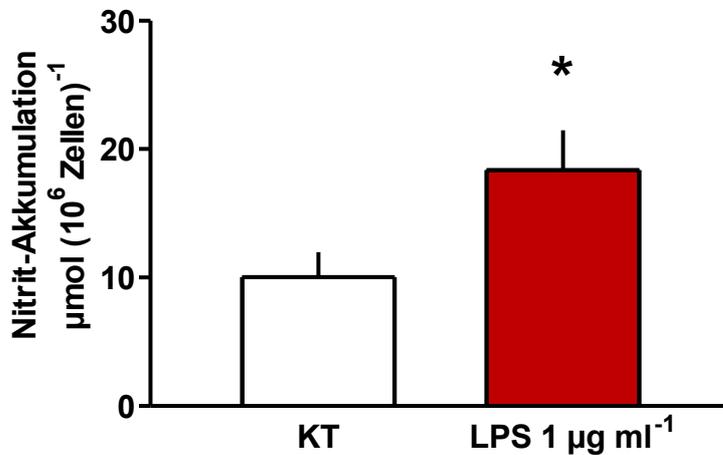


Abb. 4: Wirkung von LPS auf die iNOS-Aktivität in Alveolarmakrophagen der Ratte. Nach einer einstündigen Inkubation der Makrophagen in Ab- bzw. Anwesenheit von LPS (1μg ml⁻¹) wurde die Nitrit-Ansammlung im Kulturmedium gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte + SEM in [μM (10⁶ Zellen)⁻¹] von jeweils 6 Experimenten. Signifikanz des Unterschiedes in Bezug auf die entsprechende Kontrolle: * P< 0,05.

III. AKTIVITÄT DER iNOS UND DER ARGINASEN UNTER DER WIRKUNG VON OA FÜR 20 h

Grundlage für unsere Versuche mit dem selektiven Inhibitor Okadeinsäure bildete die Beobachtung, dass die OA-empfindlichen Phosphatasen 1α, 1β, 1γ und Phosphatase 2 in Alveolarmakrophagen der Ratte konstitutiv exprimiert werden (vgl. Abb. 19). Nach dem Standardprotokoll wurden die Alveolarmakrophagen in An- bzw. Abwesenheit von OA in steigender Konzentration beginnend mit 10 nM für 20 h inkubiert und anschließend entweder der Überstand oder die Zellysate für die entsprechenden Enzym-Assays herangezogen.

III.1. Quantifizierung der iNOS-Aktivität unter dem Einfluss von OA für 20 h

Unsere Versuche zeigten einen zunehmend signifikanten Aktivitätsanstieg beginnend bei 30 nM OA mit Erreichen von Höchstwerten bei 100 nM. Allerdings muss betont werden, dass die Größenordnung des durch Okadeinsäure erreichten Anstiegs der Nitrit-Akkumulation bei maximal der Hälfte des für die gleiche Zellpopulation bestimmten LPS-Effektes lag.

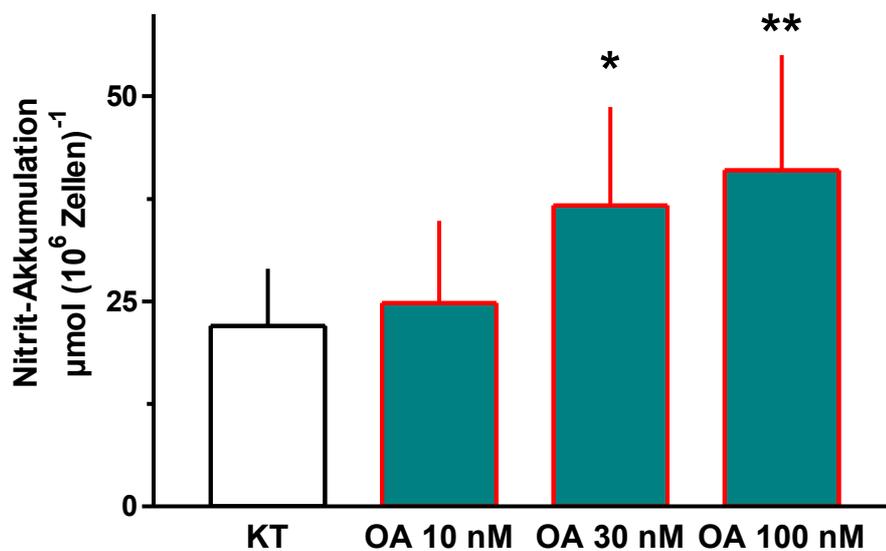


Abb. 5: Wirkung von OA auf die iNOS-Aktivität im Kulturmedium von Makrophagen nach zwanzigstündiger Kultur in Ab- oder Anwesenheit von OA in steigender Konzentration. Es wurden die Mittelwerte + SEM von 8-10 unabhängigen Experimenten in [$\mu\text{M} (10^6 \text{ Zellen})^{-1}$] bestimmt. Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle: * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$.

III.2. Quantifizierung der Arginasen-Aktivität unter dem Einfluss von OA für 20 h

In den Zelllysaten war nach zwanzigstündiger OA-Einwirkung eine ab 30 nM signifikant gesteigerte Arginasen-Aktivität zu messen, welche bei 100 nM Höchstwerte erreichte (Abb. 6). Es sei erwähnt, dass in einer zweiten Versuchsserie zusätzlich OA-Konzentrationen jenseits der 100 nM appliziert wurden, welche aber

ab 300 nM und aufwärts einheitlich einen Rückgang der Arginasen-Aktivität um mehr als 50% unter das Kontrollniveau hervorriefen (Abb. 7).

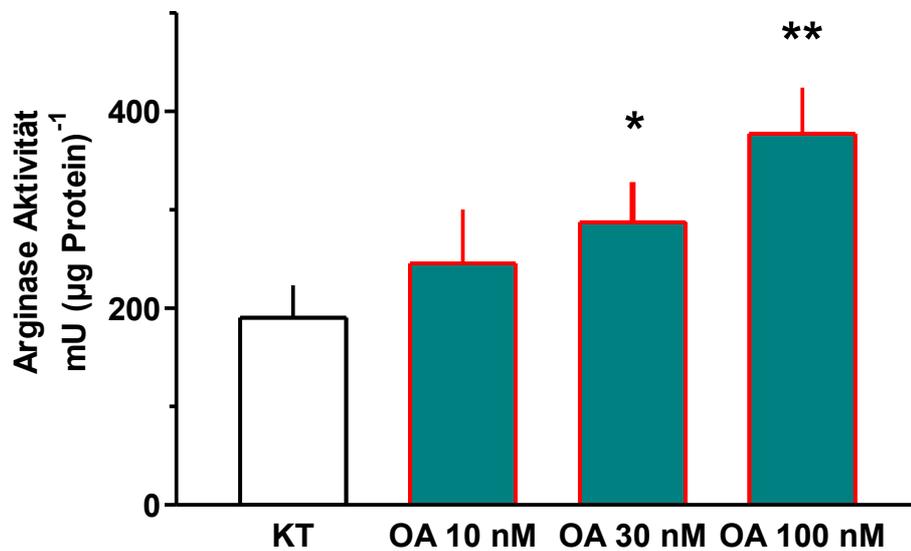


Abb. 6: Effekt von OA auf die Arginasen-Aktivität von Alveolarmakrophagen der Ratte nach zwanzigstündiger Einwirkung. Höhe der Säulen: Mittelwerte der gemessenen Arginasen-Aktivität von 7 Experimenten ausgedrückt als [mU (µg Protein)⁻¹]. Die entsprechenden SEM-Werte sind durch Strichbalken über den Säulen angezeigt. Signifikanzen der Unterschiede versus die entsprechende Kontrolle: * P < 0,05; ** P < 0,01.

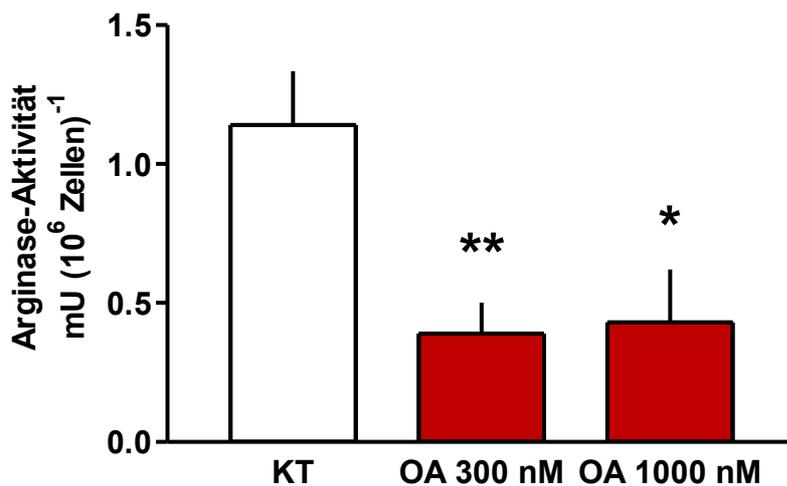


Abb. 7: Einfluss von OA auf die Arginasen-Aktivität in einer Konzentration von 300 und 1000 nM nach zwanzigstündiger Einwirkung. Gegeben: Mittelwerte + SEM. Ungepaarter t-Test modifiziert nach Welch bei n=2-3. Signifikanter Abfall der Arginasen-Aktivität im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle mit ** P < 0,005 und * P < 0,05.

IV. AKTIVITÄT DER iNOS UND DER ARGINASEN UNTER DER WIRKUNG VON OA FÜR 1 h

Das Zeitintervall der Kulturphase in Anwesenheit der Testsubstanz OA wurde auf 1 h reduziert. Am Ende der einstündigen Kulturperiode erwiesen weder die iNOS- noch die Arginase-Aktivität signifikant veränderte Werte, sondern boten unabhängig von der OA-Konzentration inhomogen schwankende Werte (Abb. 8, Abb. 9).

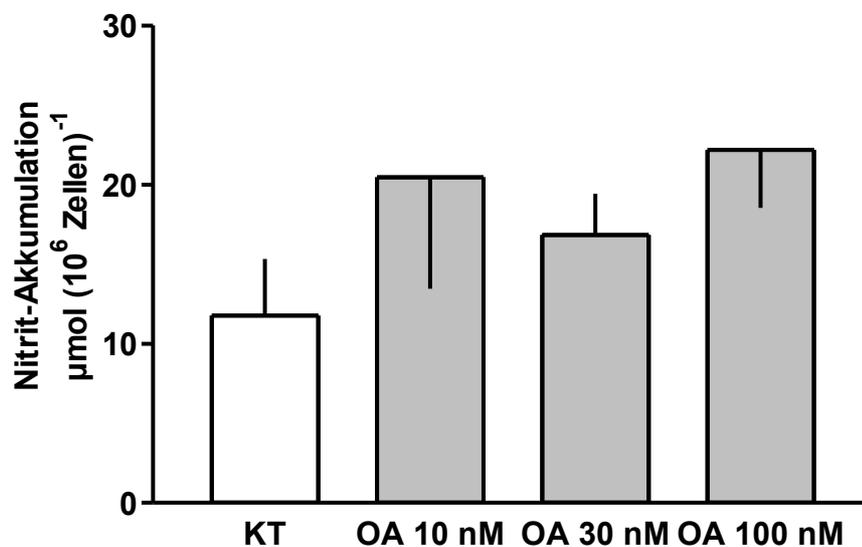


Abb. 8: Wirkung von OA auf die Nitrit-Akkumulation im Nährmedium von Alveolarmakrophagen der Ratte in einstündiger An- bzw. Abwesenheit von OA steigender Konzentration. Gezeigt sind die Mittelwerte + bzw. – SEM von 6 unabhängigen Experimenten. Mit $P > 0,05$ ist der Unterschied der jeweiligen OA-Kultur nicht signifikant zur entsprechenden Kontrolle.

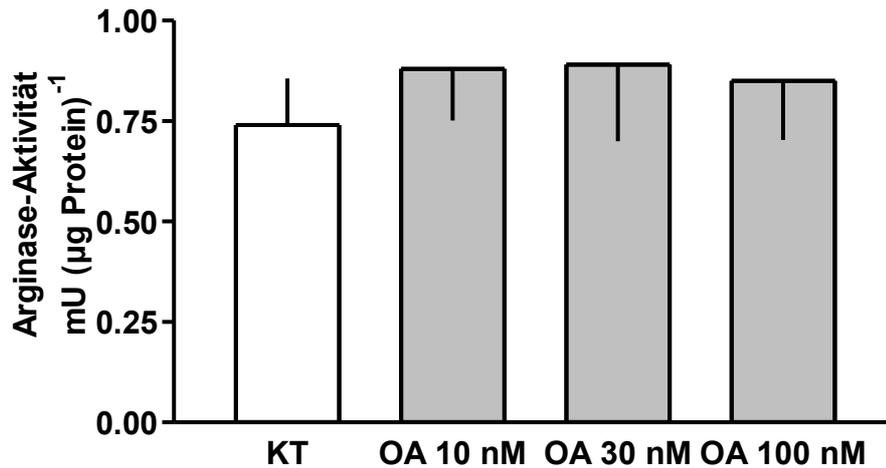


Abb. 9: Arginasen-Aktivität nach einstündiger OA-Wirkung in steigender Konzentration. Säulendiagramm der Mittelwerte + bzw. – SEM von 7 unabhängigen Experimenten. Mit $P > 0,05$ ist der Unterschied der jeweiligen OA-Präparation in Bezug auf die entsprechende Kontrolle nicht signifikant.

V. PROTEINBESTIMMUNG UND VITALITÄTSASSAY

Die zu unseren funktionellen Versuchen mit Okadeinsäure entsprechend durchgeführten Proteinbestimmungen ergaben, dass die quantitativen Schwankungen der Proteinmenge zwischen den Kontrollkulturen und den Okadeinsäure-Präparationen in einer Dosierung von 10 bis 100 nM statistisch nicht signifikant und demnach Testsubstanz-unabhängig waren.

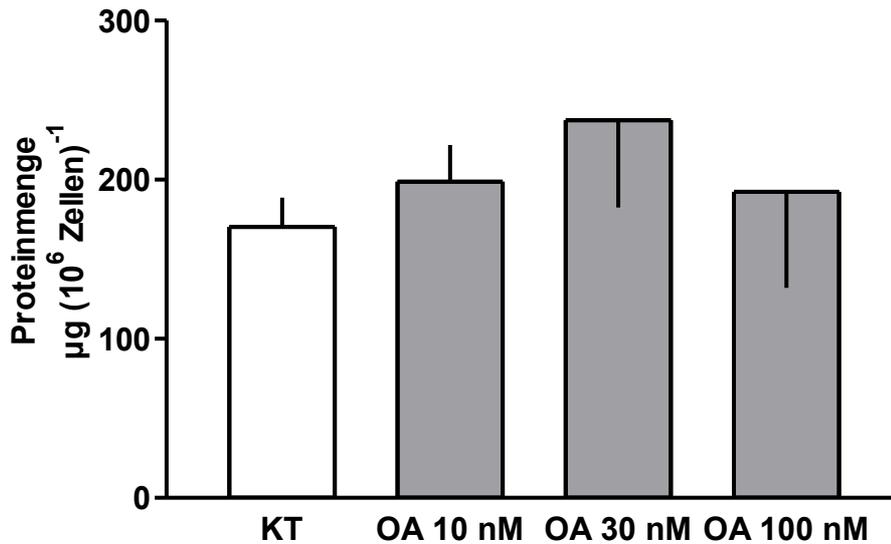


Abb. 10: Wirkung von OA auf den Proteingehalt der Zellkulturen in [$\mu\text{g} (10^6 \text{ Zellen})^{-1}$] nach zwanzigstündiger Inkubation in Ab- bzw. Anwesenheit von OA in entsprechender Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte + bzw. - SEM von 14 unabhängigen Experimenten. Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle: $P > 0,05$.

Anlass zur Durchführung einer Vitalitätsuntersuchung der Zellen gaben uns Proteinbestimmungen, welche von einer anderen arbeitstechnisch unabhängigen Forschungsgruppe aus unserem Labor im Rahmen der ^3H -L-Arginin-Aufnahme von Alveolarmakrophagen mit den gleichen Testsubstanzen durchgeführt wurden und einen abrupten Abfall jenseits der 100 nM markierten (Abb. 11). Die Versuchsergebnisse der Zellvitalitätsuntersuchungen bei denen die gleichen OA-Konzentrationen angewendet wurden, ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollpopulation, sondern wiesen durchgehend konstante Werte auf (Abb. 12).

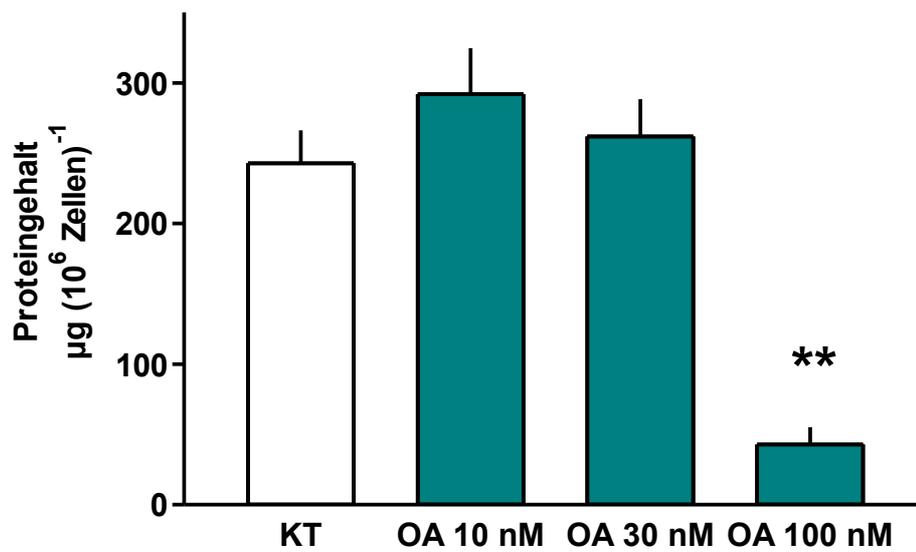


Abb. 11: Effekt der zwanzigstündigen Ab- bzw. Anwesenheit von OA in steigender Konzentration auf den terminalen Proteingehalt der Zellkulturen nach einer intensiven Waschprozedur nach Arbeitsprotokoll. Angegeben sind die Mittelwerte der Experimente + SEM in [μM (10^6 Zellen) $^{-1}$] von 14 unabhängigen Experimenten. Signifikanz der Unterschiede bezogen auf die Kontrolle: ** $P < 0,01$.

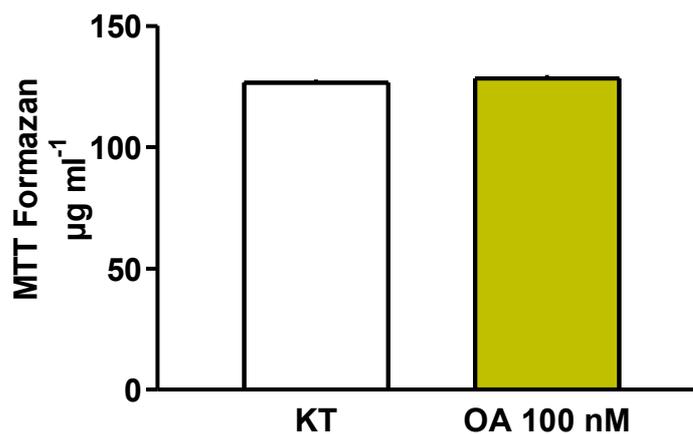


Abb. 12: Effekt der Ab- bzw. Anwesenheit von OA in steigender Konzentration auf die Zellvitalität, gemessen als den Ertrag von MTT-Formazan in $\mu\text{g ml}^{-1}$ am Ende der zwanzigstündigen Kulturperiode. Veranschaulicht sind die Mittelwerte + SEM von jeweils 6 unabhängigen Experimenten. Mit $P > 0,05$ ist der Unterschied der OA-Kultur in Bezug auf die entsprechende Kontrolle nicht signifikant.

VI. EINFLUSS VON LPS AUF DIE EXPRESSION VON iNOS, ARGINASE I UND II

VI.1. mRNA-Expression von iNOS unter der Wirkung von LPS

Vor dem Hintergrund des Aktivitätsanstiegs der iNOS unter LPS analysierten wir die Expression der iNOS-mRNA in Alveolarmakrophagen der Ratte nach Behandlung der Zellen mit LPS für 20h. Abb. 13 zeigt exemplarisch die fotografische Aufnahme des nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte dokumentierten Agarosegels. Die in den vorangehenden funktionellen Versuchen beobachtete reaktive Aktivitätszunahme der iNOS als Antwort auf LPS war von einer erhöhten iNOS-Gentranskription begleitet (quantitative Auswertung Abb. 14), während die entsprechenden cDNA-Banden nach RT-PCR der Kontrollpopulationen eine kaum bis gering darstellbare Expression aufwiesen.

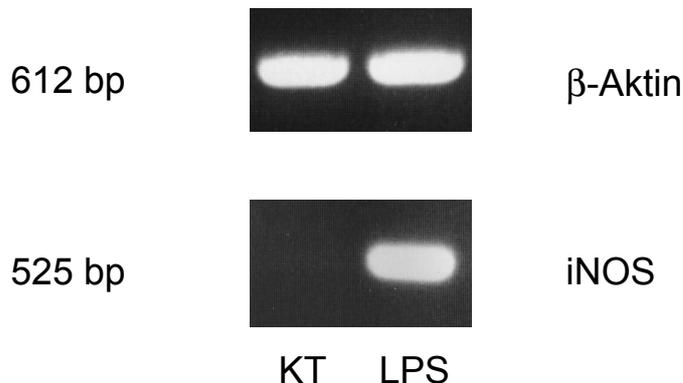


Abb. 13: mRNA-Expression der iNOS in Alveolarmakrophagen der Ratte unter Kontrollbedingungen und nach zwanzigstündiger LPS-Exposition. Als interner konstant exprimierter Kontrollstandard wurde β -Aktin verwendet. Dieses Resultat konnte in 6 voneinander unabhängigen Versuchen unter gleichen Versuchsbedingungen reproduziert werden.

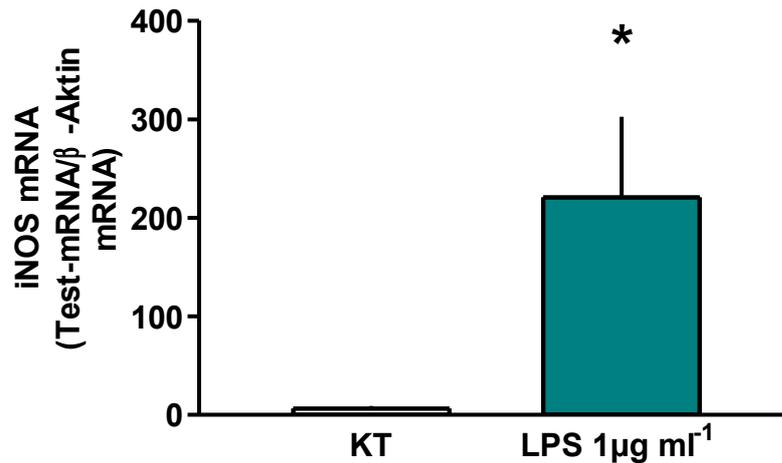


Abb. 14: Änderungen der iNOS-mRNA-Expression nach zwanzigstündiger Kultur von Alveolarmakrophagen der Ratte mit bzw. ohne den Zusatz von LPS. Angegeben sind die Mittelwerte + SEM von 6 unabhängigen Experimenten. Signifikanz des Unterschiedes im Vergleich zur Kontrolle: * P < 0,05.

VI.2. mRNA-Expression von Arginase I und II unter der Wirkung von LPS

Auch hier wurde die Arginasen-mRNA aus unstimulierten bzw. aus mit LPS (1 μg ml⁻¹) behandelten Makrophagen nach zwanzigstündiger Einwirkung mittels RT-PCR analysiert. Wie Abb. 15 und 16 nachfolgend dokumentieren, wurde unter Kontrollbedingungen mRNA sowohl für die Arginase I als auch für die Arginase II detektiert, wobei Arginase I grundsätzlich bereits nach 25-PCR-Zyklen optisch klar darstellbar war, während Arginase II für eine viel schwächere Darstellung 35 Zyklen benötigte. Beide Versuchsergebnisse fielen jedoch durch die deutliche Signalverstärkung der Arginase-Amplifikationsbanden unter OA im Vergleich zu den Kontrollbanden auf.

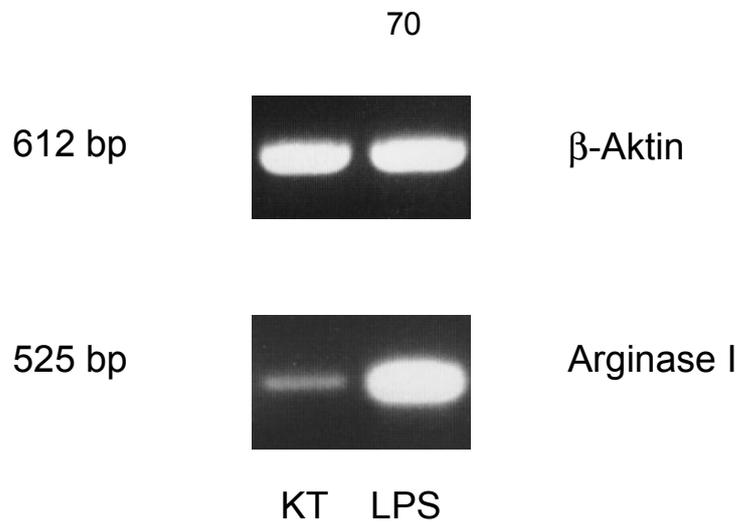


Abb. 15: mRNA-Expression von Arginase I am Ende einer zwanzigstündigen Kulturperiode Alveolarmakrophagen der Ratte in An- bzw. Abwesenheit von LPS $1\mu\text{g ml}^{-1}$. Repräsentativer Auszug aus der fotografischen Dokumentation von 6 unabhängigen RT-PCR-Ergebnissen.

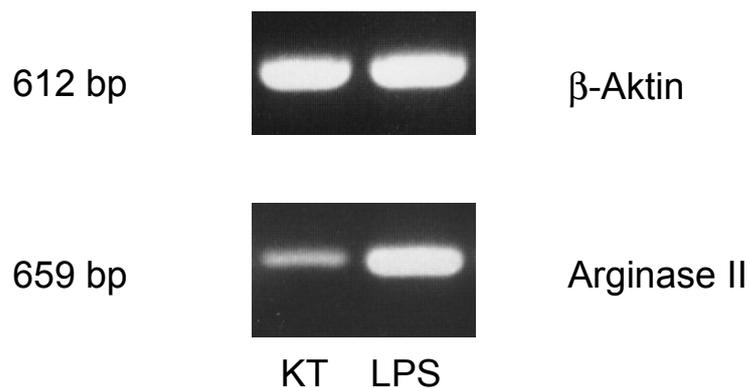


Abb. 16: mRNA-Expression von Arginase II in Alveolarmakrophagen der Ratte nach zwanzigstündiger LPS-Exposition im Vergleich zur entsprechenden Kontrollkultur. Repräsentativer Gel-Ausschnitt eines von 6 ähnlichen RT-PCR-Ergebnissen.

VII. EXPRESSIONSMUSTER DER PHOSPHATASEN 1α , 1β , 1γ UND PP 2

Als Angriffsziel unserer oben verwendeten Testsubstanz OA gelten die Phosphatasen 1α , 1β , 1γ und PP 2. Voraussetzung für einen sinnvollen OA-Einsatz ist, dass die zu untersuchenden Zellen die erwähnten Phosphatasen auch tatsächlich

exprimieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst mittels RT-PCR das Expressionsmuster der genannten Phosphatasen in Alveolarmakrophagen der Ratte überprüft.

VII.1. Expressionsmuster der PP 1 α , 1 β , 1 γ und PP 2 unter Kontrollbedingungen

Bereits nach 25 PCR-Zyklen kamen klar detektierbare Amplifikationsbanden von allen vier untersuchten Genprodukten zum Vorschein, die der zugrunde liegenden mRNA entsprachen (Abb. 17). Zwar ließ die relative Stärke der Signale vermuten, dass PP 1 α in Alveolarmakrophagen vorherrschend vertreten war; dennoch sind solche quantitativen Aussagen bzgl. der Expression nur unter Vorbehalt erlaubt, da die RT-PCR lediglich semiquantitativer Bewertungen erlaubt.

VII.2. Expressionsmuster der PP 1 α , 1 β , 1 γ und PP 2 unter LPS

Um einen potentiell induktiven Effekt der bakteriellen Endotoxine auf die Expression der Phosphatasen selbst zu erfassen, wurde die entsprechende mRNA nach einer zwanzigstündigen Inkubation der Kulturzellen in Anwesenheit von LPS (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) extrahiert und mittels RT-PCR beurteilt. Die resultierten Amplifikationsprodukte der LPS-behandelten Zellen wiesen ausnahmslos ein gleichbleibendes, der Kontroll-mRNA vergleichbares Expressionsmuster auf.

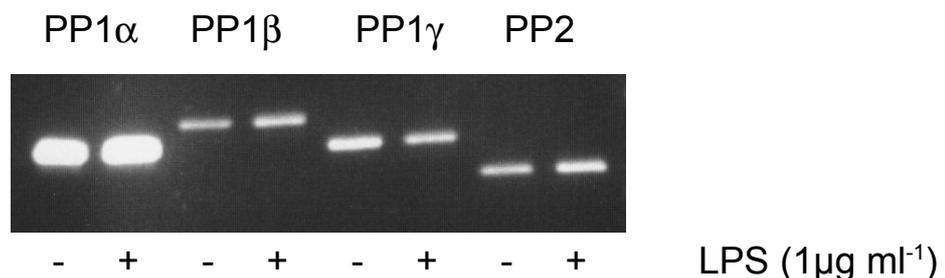


Abb. 17: Einfluss von LPS auf das mRNA-Expressionsmuster der Proteinphosphatasen PP 1 α , PP 1 β , PP 1 γ und PP 2 in Ratten-Alveolarmakrophagen. Die Zellen wurden 20 h in Ab- oder Anwesenheit von LPS (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) kultiviert und anschließend zur Extraktion der zytosolischen Total-mRNA lysiert und gereinigt. Die Zielsequenz der mRNA wurde nach RT durch PCR unter dem Einsatz spezifischer Primerpaare zum Doppelstrang amplifiziert und sichtbar gemacht. Gezeigt ist 1 von 4 unabhängigen repräsentativen Experimenten.

VIII. EINFLUSS VON OA AUF DIE EXPRESSION VON iNOS, ARGINASE I UND II

In Anlehnung an die Ergebnisse der funktionellen Versuche mit OA wurde die mRNA der Kulturzellen unter gleichen Versuchsbedingungen anschließend zur RT-PCR herangezogen. Zeitgleich liefen Parallelversuche für das Kontroll-Transkript β -Aktin als internen Standard. In den nachfolgenden Abbildungen ist jeweils das Bildergebnis eines repräsentativen Experiments festgehalten, während die Diagramme die dazugehörigen gemittelten Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Versuchen reproduzieren.

VIII.1. mRNA-Expression von iNOS unter der Wirkung von OA

In Korrelation zu den funktionellen Versuchen und dem dabei beobachteten Aktivitätsanstieg, erfuhr die mRNA-Expression der iNOS unter der Wirkung von OA eine signifikante Zunahme (Abb. 18 und 19), jedoch nicht in derselben Größenordnung wie durch LPS -unter dem Vorbehalt, dass es sich wieder um semiquantitative Ergebnisse handelt. Das PCR-Signal wurde erst ab einer Okadeinsäure-Konzentration von 30 nM deutlich sichtbar.

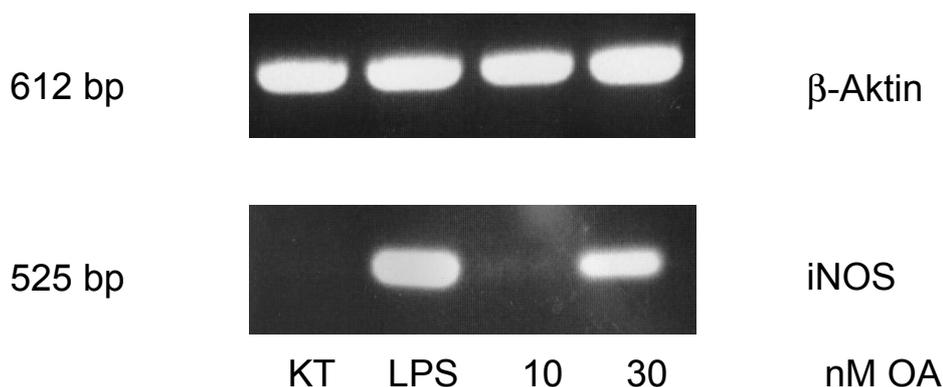


Abb. 18: Einfluss von LPS und OA auf die mRNA-Expression von iNOS. Repräsentative PCR-Aufnahme aus einer Serie unabhängiger Experimente (n=6). Ratten-Alveolarmakrophagen wurden 20 h in An- oder Abwesenheit von LPS ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) und OA in entsprechender Konzentration inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-mRNA präpariert und zwecks RT-PCR mit jeweils spezifischen Primern verwendet.

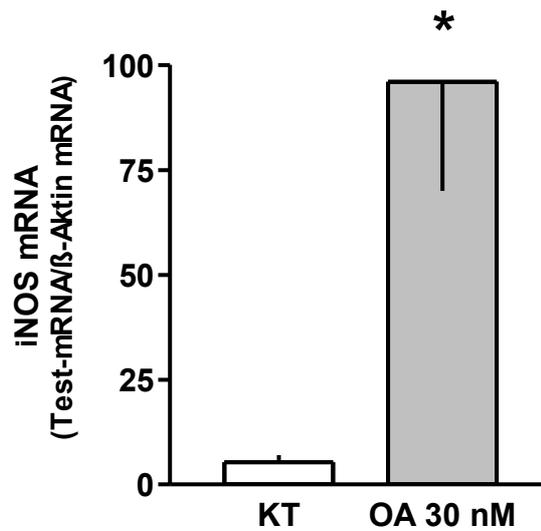


Abb. 19: Wirkung einer zwanzigstündigen An- bzw. Abwesenheit von OA auf die mRNA-Expression der iNOS in Ratten-Alveolarmakrophagen. Graphische Darstellung nach esitometrischer Auswertung. Die optische Dichte der iNOS-mRNA wurde in Relation zur Dichte von β -Aktin gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte des resultierenden Quotients von jeweils 6 Experimenten + bzw. - SEM. Signifikanzen der Unterschiede verglichen mit der Kontrolle: * $P < 0,005$.

VIII.2. mRNA-Expression von Arginase I und II unter der Wirkung von OA

In Abb. 20 sind die Amplifikationsprodukte der Arginase I-mRNA unter der Wirkung von OA und LPS fotografisch dokumentiert. Die erfolgte signifikante mRNA-Akkumulation im Zytosol der Alveolarmakrophagen als Folgeerscheinung des Okadeinsäure-Einflusses ist auch ohne densitometrische Evaluation an dem deutlichen Amplifikationsprodukt erkennbar, erreicht aber nicht die Größenordnung der LPS-Wirkung. Der konzentrationsabhängige mRNA-Anstieg begann in diesem Fall bei 10 nM OA und nahm bei 30 nM signifikant hohe Werte an (Abb. 21).

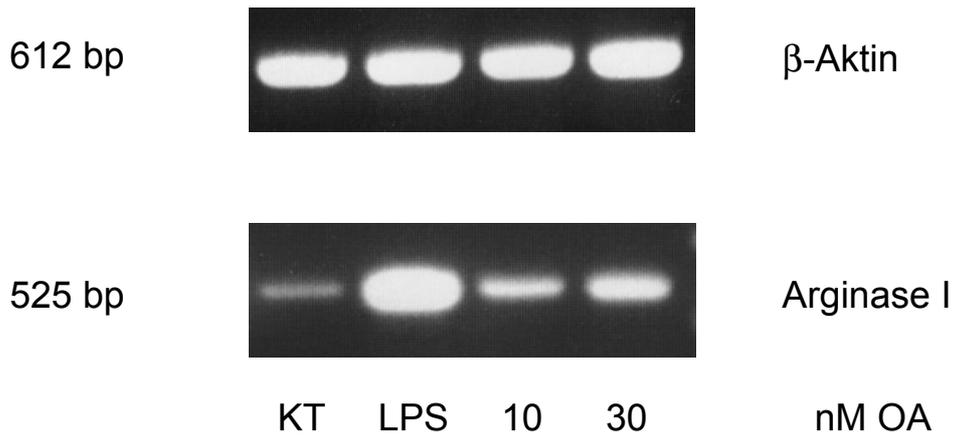


Abb. 20: mRNA-Expressionsmuster der Arginase I nach zwanzigstündiger Kultur von Alveolarmakrophagen der Ratte in Anwesenheit von LPS ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder OA (10 und 30 nM). Gezeigt ist 1 von 6 unabhängigen Experimenten mit β -Aktin als internem Standard.

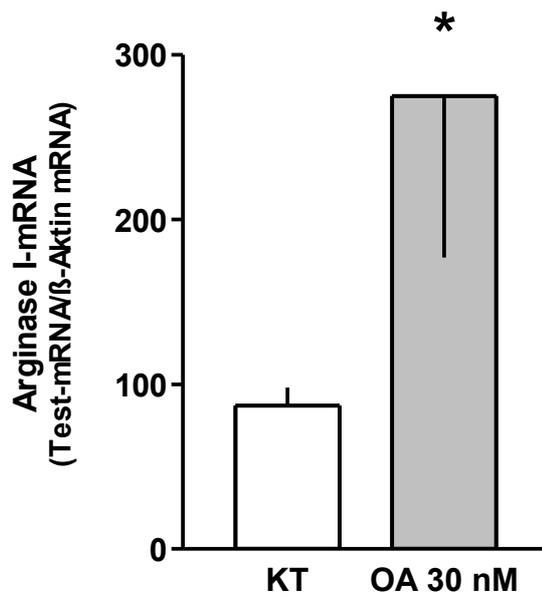


Abb. 21: Effekt der Okadeinsäure (30 nM) nach zwanzigstündiger Einwirkzeit auf die mRNA-Expression von Arginase I in Makrophagenkulturen der Ratte. Grafische Darstellung nach densitometrischer Evaluation einer Versuchsreihe aus 6 unabhängigen Experimenten. Angegeben sind die Mittelwerte des Verhältnisses von Arginase- zu β -Aktin-mRNA + bzw. - SEM. Signifikanz des Unterschiedes versus die Kontrolle: * $P < 0,05$.

Die Ermittlung der Arginase II-mRNA nach zwanzigstündiger OA-Einwirkung ergab ein ähnliches Amplifikationsverhalten. Die Ergebnisse bestätigen sowohl qualitativ

(Abb. 22) als auch quantitativ (Abb. 23) den positiven Effekt der Okadeinsäure auf die Transkriptionsrate der Arginase II. Im semiquantitativen Vergleich scheint zwar die basale Expression von Arginase I ausgeprägter zu sein als die von Arginase II (Abb. 20), sicher ist aber, dass beide Isoenzyme eine merkliche Hochregulation ihrer mRNAs über das initiale Niveau hinaus erfahren, was sich bereits bei 10 nM in den deutlich verstärkten PCR-Signalen niederschlägt, um bei 30 nM schließlich signifikante Maße anzunehmen.

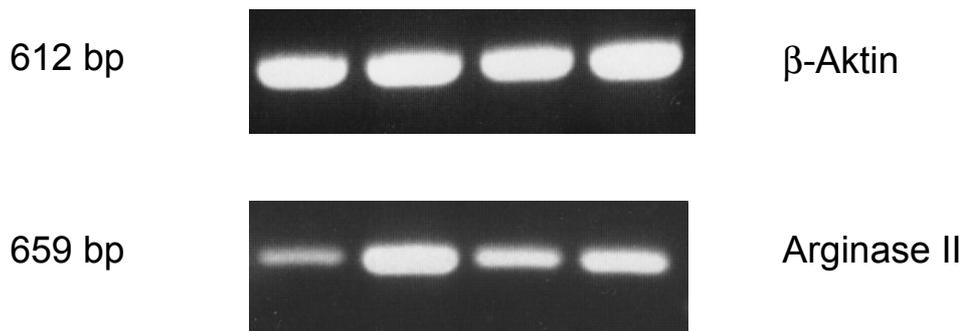


Abb. 22: Wirkung von LPS ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder OA auf die mRNA-Expression der Arginase II nach zwanzigstündiger Kultur von Ratten-Alveolarmakrophagen in An- oder Abwesenheit der Testsubstanzen. Abgebildet ist eins von insgesamt 6 Experimenten.

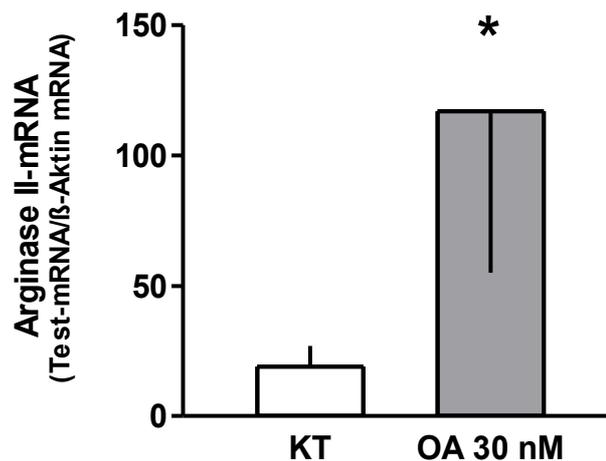


Abb. 23: Einfluss von OA auf die Arginase II-mRNA-Expression nach zwanzigstündiger Kultur von Alveolarmakrophagen der Ratte. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 6 Experimenten + bzw. – SEM. Signifikanz des Unterschiedes in Bezug auf die Kontrolle: * $P < 0,05$.

IX. EINFLUSS VON OA AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON iNOS UND ARGINASE I

IX.1. Proteinexpression der iNOS unter der Wirkung von OA

Das Immunoblotting wurde mit Antikörpern gegen die Epitope der induzierbaren NO-Synthase durchgeführt. Als Referenzprotein wurde α -Tubulin nachgewiesen, dessen Expression unabhängig von den eingesetzten Testsubstanzen nur leichte Schwankungen erkennen ließ. Nach Durchführung mehrerer unabhängiger Versuche erfolgte die densitometrische semiquantitative Auswertung der resultierten Protein-Banden. Es wurde ein signifikanter Proteinzuwachs in der zwanzigstündigen Kulturphase mit OA vermerkt (Abb. 24 und 25) in Analogie zu der oben beschriebenen mRNA-Zunahme. Aber auch im Proteingemisch der Kontrollzellen konnte mit dem iNOS-Antikörper eine selbst wenn nur schwache jedoch detektierbare Bande registriert werden (Abb. 25).

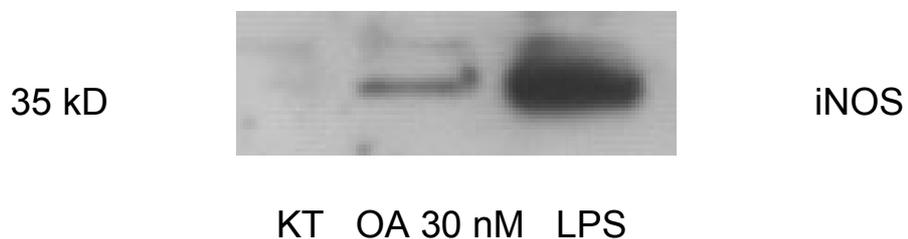


Abb. 24: Effekt von OA (30 nM) bzw. LPS ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) auf die Proteinexpression von iNOS in Alveolarmakrophagen der Ratte nach zwanzigstündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Repräsentativer Immunoblot auf der Basis eines spezifischen gegen iNOS gerichteten Antikörpers.

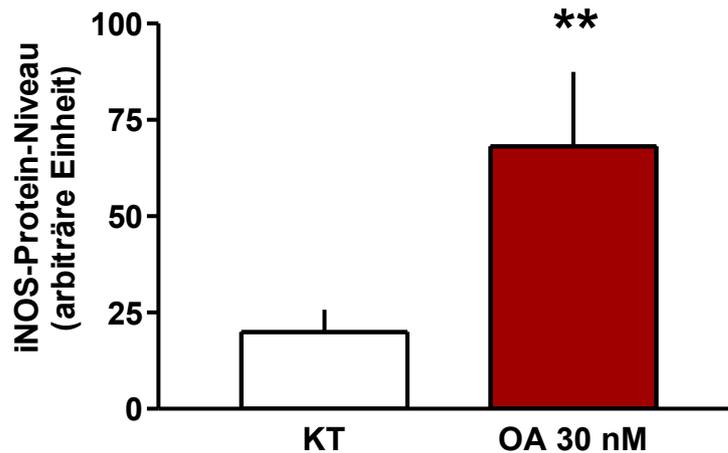
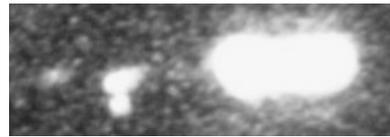


Abb. 25: Änderungen der iNOS-Proteinexpression nach zwanzigstündiger Kultur von Alveolarmakrophagen der Ratte in An- oder Abwesenheit von OA (30 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 6 unabhängigen Experimenten. Signifikanz des Unterschiedes verglichen mit der entsprechenden Kontrolle: * $P < 0,05$.

IX.2. Proteinexpression der Arginase I unter der Wirkung von OA

Da momentan die Spezifität der auf dem Markt befindlichen Antikörper gegen die Epitope der Arginase II noch unzureichend ist und Informationen aus früheren Untersuchungen und Berichten (Klasen et al., 2001) für eine Arginase I-Dominanz in alveolären Makrophagen der Spezies Ratte sprechen, wurde lediglich die Expression der Arginase I in Alveolarmakrophagen der Ratte untersucht. Bereits unter Kontrollbedingungen ist Arginase I in der Zelle deutlich vorhanden, deren Protein-Niveau wird aber durch die zwanzigstündige Anwesenheit von OA signifikant gehoben, was bei der Betrachtung der semiquantitativen Auswertung besonders veranschaulicht wird (Abb. 26 und 27).



KT OA 30 nM

Abb. 26: Repräsentativer Immunoblot durchgeführt mit Antikörpern gegen Arginase I nach Proteinextraktion aus Alveolarmakrophagen der Ratte im Anschluss an eine zwanzigstündige Kulturperiode in Ab- bzw. Anwesenheit von OA (30 nM). Repräsentatives Experiment.

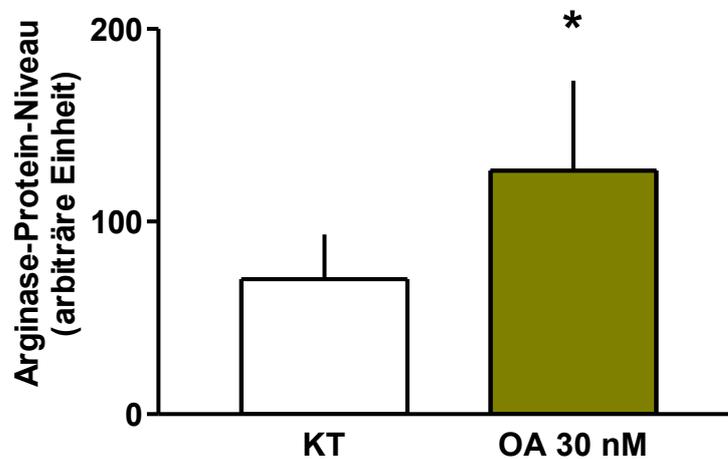


Abb. 27: Effekt von OA (30 nM) auf die Protein-Expression von Arginase I nach zwanzigstündiger Kulturperiode. Untersucht wurden Proteinextrakte von Alveolarmakrophagen der Ratte, gewonnen aus Kontrollzellen oder aus OA-behandelten Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von 6 unabhängigen Immunoblots. Signifikanz des Unterschiedes verglichen mit der Kontrolle: * $P < 0,05$.

E. DISKUSSION

Die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Serin- und Threoninresten von Proteinen stellt einen wesentlichen Regulationsmechanismus verschiedener zellulärer Prozesse und Signalkaskaden dar, wie z.B. der Genexpression, Zellzyklusabfolge oder der Apoptose (Brüne et al., 1992). Änderungen des Phosphorylierungszustands von zellulären Proteinen führen zu veränderten Expressionsmustern spezifischer Gene und nachfolgend zu veränderten Stoffwechsellustern. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das Expressionsmuster von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen in Alveolarmakrophagen der Ratte zu untersuchen und ihre funktionelle Bedeutung bei der Regulation des Argininstoffwechsels durch die NO-Synthasen und die Arginasen näher zu beleuchten.

I. Enzymatische Aktivität, Induzierbarkeit und Expressionsmuster von iNOS, Arginase I und II unter LPS

Bakterielle Lipopolysaccharide induzieren effektiv die NO- und Ornithinproduktion in Alveolarmakrophagen der Ratte

Wurden Alveolarmakrophagen der Ratte einer zwanzigstündigen Inkubation in Gegenwart von bakteriellen Lipopolysacchariden zur Simulation eines inflammatorischen Prozesses unterzogen, so konnte in den entsprechenden Enzym-Assays der bekannte Effekt der massiven Aktivitätszunahme sowohl der iNOS als auch der Arginase herbeigeführt werden, wobei aus den funktionellen Versuchen allein nicht auf die Arginasen-Isoenzyme zurückgeschlossen werden kann. Vorausgegangene bereits veröffentlichte Untersuchungen (Waddinton et al., 1998) ergaben aber in Übereinstimmung mit molekularbiologischen Ergebnissen aus unserem Labor (Klasen et al., 2001; Lindemann & Racké, 2003), dass der Anstieg der enzymatischen Umsatzrate auf das Konto beider Isoenzyme geht, wobei Arginase I den tragenden Anteil erwirkt und somit am Entzündungsgeschehen das dominanteren Isoenzym ist. Ebenfalls wird die extensiv untersuchte Stimulationswirkung von LPS in der NO-Produktion auf die induzierbare NO-Synthase zurückgeführt (Corraliza et al., 1995; Kobzik et al., 1993).

Primärmakrophagen scheinen neben geringen Mengen der endothelialen nahezu nur die induzierbare Form der NO-Synthasen zu exprimieren (MacMicking et al., 1997). Interessanterweise erwies sich der Anstiegsgrad des akkumulierten Nitrits während der Kulturphase mit LPS als recht konstant, wohingegen die absolute Nitrit-Menge unter Kontrollbedingungen stärker schwankte. Es liegt in der Natur der Zellpoolaufbereitung, dass bei Verwendung und Vereinigung von Primärzellen unterschiedlicher Individuen ein Zellpool nicht-identischer Elemente –d.h. mit voneinander unterschiedlichen Epitopen- entsteht. Als Einflussfaktoren für die individuellen biologischen Unterschiede sind ferner die schwankenden Umgebungstemperaturen und -bedingungen bei der Tierhaltung, das unterschiedliche Alter der Tiere und die individuell unterschiedliche Keimexposition der Tiere zu nennen, da ihre Haltung nicht unter sterilen Bedingungen stattfand. Zusätzlich stellt der Isolierungsvorgang an sich aufgrund der mechanischen Manipulation einen weiteren stimulierenden Störfaktor dar. Nicht auszuschließen ist darüber hinaus die Existenz unspezifischer immunstimulierender Mediumbestandteile.

Die gleichzeitige Aktivitätszunahme der iNOS und der Arginase in denselben Makrophagenkulturen unter LPS mit resultierender Ertragserhöhung ihrer Stoffwechselprodukte, des Nitrits und des Harnstoffs, bestätigen das berichtete Phänomen der Koinduktion (Wang et al., 1995). Verfeinernd ergaben zusätzliche Untersuchungen, dass die induzierbare NO-Synthase im Entzündungsgeschehen zeitlich früher hochreguliert wird als die Arginase (Klasen et al., 2001; Boucher et al., 1999), was ihre primär immunabwehrende Rolle bezeugt, während die eher anabole, gewebesaufbauende Rolle der Arginase vorzugsweise in der späteren Phase der Entzündung angetroffen wird. Auch Cook et al. 1994 beobachteten, dass der Zeitraum der hochregulierten Arginase-Aktivität nach Gewebestress zu der fibroproliferativen, d.h. späten Phase der hervorgerufenen Entzündungsreaktion korrespondierte, welche zwar im Vergleich zur iNOS-Induktion zeitlich verzögert einsetzte, dafür aber die gewebesaufbauende Rolle der Arginase im Sinne der lokalen reparativen Prozesse bestätigte, da ihre Aktivität bis in die späte Erholungsperiode auch nach Beseitigung der Noxe andauerte. An dieser Stelle sei daran erinnert, dass zur Vermeidung einer Konkurrenzsituation um das gemeinsame Substrat L-Arginin, dieses in unseren Versuchen stets im Überschuss appliziert wurde, um einen

relativen Substratmangel als Einflussfaktor ausschließen zu können. Entsteht jedoch in vivo durch exogene Faktoren wie Trauma oder Entzündung für die nebeneinander exprimierten aber konkurrierenden Enzyme eine relative Substratmangel-Situation, so überwiegt abhängig vom Zelltyp die NO- oder die Harnstoff-Synthese (Wu & Morris, 1998).

Angesichts der Vielfalt an Einflussmöglichkeiten, die einer Zelle nach Induktion zwecks Eigenaktivierung zur Verfügung stehen, zeichnen sich die verschiedenen Hochregulationsmaßnahmen durch ihren unterschiedlichen Zeitbedarf aus. Die Ergebnisse der zwanzigstündigen Versuche lieferten Summeninformationen über Ereignisse, die sich auf jeder Ebene, angefangen von der Transkription bis zur posttranslationalen Phase, abgespielt haben können. Durch Verkürzung der Einwirkzeit der Testsubstanzen beabsichtigten wir akute Wirkungen, sog. posttranslationelle Veränderungen am bereits fertigen Protein, wie z.B. Konformationsänderungen nach allosterischem oder kompetitivem Muster oder chemische Veränderungen wie die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung, zu erfassen, da das kürzere Zeitintervall die in der Regel zeitaufwendige Proteinsynthese nach Aktivierung entsprechender Gene gar nicht zu berücksichtigen erlaubt. Die ausbleibende akute Aktivitätserhöhung der Arginase unter LPS-Wirkung impliziert, dass die Hochregulation der entsprechenden Isoenzyme primär auf Expressionsebene bewerkstelligt wird. Auch das unterschiedliche Ausmaß der iNOS-Hochregulation unter ein- (signifikanter) und zwanzigstündiger (hochsignifikanter) LPS-Wirkung weisen auf eine primär über die Expression regulierte Enzymaktivität hin, zumindest was den Induktor LPS anbetrifft. Dies steht auch mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen in Einklang (Klasen et al., 2001; Eissa et al., 1996; Xie et al., 1992). Insbesondere aber im Fall iNOS scheint eine differenziertere Regulation im Sinne einer Kombinationsregulation mit kurz- und längerfristigen Mechanismen für die resultierende Gesamtaktivität der iNOS verantwortlich zu sein. Klasen et al. 2001 registrierten in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen den erhaltenen iNOS-mRNA-Ergebnissen und der Einwirkdauer von LPS, wobei die LPS-Wirkung auf die iNOS der Ratten-Alveolarmakrophagen bereits nach zweistündiger Einwirkzeit mit einer signifikanten Transkriptionszunahme anschluss, während Arginase I für ein entsprechendes Ergebnis 5 h benötigte. Auf der anderen Seite sind auch posttranslationelle

Ereignisse bei der Regulation der iNOS beobachtet worden, wenn auch diese lediglich eine untergeordnete Rolle spielen (Kolodziejcki et al., 2004; Miura et al., 1997). Demzufolge spiegeln die einstündigen funktionellen Ergebnisse unserer Versuchsreihe vermutlich die kombinierte Folge von akuten bzw. kurzfristigen und früher einsetzenden Interventionsmechanismen zusammen mit einer überdurchschnittlich schnellen induktorvermittelten Hochregulation der iNOS-Transkription wider, welche sich gemeinsam nach weiterer Einwirkzeit, an entsprechenden hochsignifikanten Aktivitätsänderungen ablesbar, in vollen Zügen entfalten (vergleiche hierzu Abb. 1). Zwar fallen posttranslationelle Mechanismen anteilmäßig nicht so stark ins Gewicht wie Regulationsprozesse auf Expressionsebene (Klasen et al., 2001; Geller et al., 1993; Xie et al., 1992), sind aber für den frühen Einsatz der iNOS im Entzündungsgeschehen zweifellos mitbestimmend. Offenbar wird aber der für die iNOS-Regulation wichtigste Mechanismus der iNOS-Expression mit beeindruckender Geschwindigkeit in Gang gesetzt, was ebenfalls den akuten Charakter der iNOS-Funktion unterstreicht (Boucher et al., 1999; MacMicking et al., 1997).

Die Regulation der Arginasen-Enzyme ist auf der anderen Seite noch nicht in vergleichbar eingehendem Umfang in der Literatur beschrieben worden. Die erhobenen Daten der funktionellen Versuchsreihe mit ausbleibenden Aktivitätsänderungen nach einstündiger LPS-Wirkung aber implizierten eine ebenfalls vornehmlich auf Expressionsebene geleistete Regulation der Arginasen, vermutlich ohne Mitwirkung koexistenter kurzfristiger Regulationsprozesse.

Hochregulation der mRNA-Expression von iNOS, Arginase I und II unter LPS

Zur Verifizierung o.g. funktioneller Ergebnisse und zwecks Überprüfung der entsprechenden Mutmaßungen wurde zunächst die Transkriptionsrate für die jeweiligen Enzyme mittels RT-PCR überprüft. In Analogie zur registrierten Basalaktivität der Arginase unter Normalbedingungen, wiesen unbehandelte Zellen einen Basalgehalt an Arginase I- und II-mRNA auf, welche der Transkriptionsaktivität im sog. steady state, der relativen biochemischen Gleichgewichtssituation der Zelle, entspricht und die konstitutive Expression beider Arginasen-Isoenzyme belegt. Zwar liegen in der Literatur auch einige ältere Berichte über eine überwiegende Arginase II-Expression in Makrophagen vor (Carraway et al., 1998; Que et al., 1998), aber hier

lagen Unterschiede im Isolationsverfahren, im Untersuchungsmaterial (Peritoneal- statt Alveolarmakrophagen) oder in den eingesetzten Nachweismethoden -ausschließlich Western-Blot statt PCR- vor. Interessanterweise fiel die Hochregulation der Arginase I in besagtem Experiment nach pulmonaler Stressanwendung durch in vivo 100%-O₂-Exposition von Ratten mit 400% versus 88% drastischer aus als die von Arginase II (Que et al., 1998). Fest steht, dass die Arginasen eine gewichtige immunoreaktive Rolle in inflammatorischen Geschehen spielen, wobei es zur genaueren qualitativen Differenzierung der beiden Unterformen weiterer Untersuchungen unter Zuhilfenahme spezifischer Arginase I- bzw. Arginase II-Inhibitoren bedarf. Die derzeitige Datenlage bzgl. Alveolarmakrophagen von Sprague-Dawley-Ratten spricht jedenfalls für eine Arginase I-Dominanz, sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Stimulation (Klasen et al., 2001; Waddington et al., 1998). Erfahrungsgemäß ist ihre mRNA bereits nach 25 PCR-Zyklen durch Amplifikation darstellbar, während Arginase II erst nach 35 Zyklen ihr vergleichsweise schwächeres Signal abgibt. Hinzu kommt, daß die Antikörper, welche bis dato für den Nachweis des Arginase II-Proteins mittels Western-Blots zur Verfügung stehen, hinsichtlich ihrer Spezifität inkonstantes Verhalten aufweisen und somit für die Datenverarbeitung unvollständige Informationen liefern, so dass momentan zwecks Prüfung der Arginase II-Gen-Expression der Nachweis von mRNA dem Western Blot vorzuziehen ist. Klasen et al. 2001 schlugen für die Expressions-Dissonanz der Arginase-Isoenzyme ferner einen in-vitro-Mangel essentieller Faktoren vor, die im physiologischen Umfeld der Lunge bereitgestellt werden und dort ebenfalls die Expression von Arginase II-mRNA stimulieren oder ihren Abbau hemmen würden. Überdies muss in Kenntnis genommen werden, dass beim ergebnisorientierten Vergleich von Literaturdaten über gleichartige Entzündungszellen -in diesem Fall Makrophagen- diese keine streng einheitliche Population darstellen sondern organabhängige substanzielle Unterschiede aufweisen, die sich in ihrem Antwortverhalten auf Stimuli und Inhibitoren widerspiegeln (Wang et al., 1999; Lowman et al., 1988). Dabei unterliegt bekanntlich selbst die konstitutive Enzymexpression modulierenden Einflüssen, die nicht immer identifiziert werden können (Que et al., 1998). Den PCR-Ergebnissen zufolge steht jedoch fest, dass die registrierte Hochregulation der Arginasen-Gesamtaktivität unter zwanzigstündiger LPS-Einwirkung in den funktionellen Experimenten mit einer analog verstärkten Transkription beider Isoenzym-Gene einherging, was die

zunächst aufgestellte Vermutung der primären Enzymregulation über entsprechende Änderungen seiner Expressionsrate massiv erhärtete.

Reichlichen Fluktuationen unterliegt auch die intrazelluläre Konzentration der iNOS, wobei die konstitutiven Enzyme selbst Schwankungen aufweisen (MacMicking et al., 1997). Definitionsgemäß ist die mRNA des induzierbaren Isoenzym unter Kontrollbedingungen nicht darstellbar. Einige Ergebnisse der RT-PCR-Versuche zeugten jedoch von einer schwankenden, geringfügigen Expression der iNOS in den Kontrollzellen, welche mit den Nitrit-Schwankungen der funktionellen Versuche korrelierten, und ebenfalls wie diese auf nicht erfassbare Stimulationsparameter wie die nicht absolut keimfreie Haltung zurückgeführt werden. Solche transienten Schwankungen des Basalniveaus sind in der Literatur zu Genüge beschrieben (Chang et al., 1998; Nathan & Hibbs, 1991), allerdings galt auch hier, dass der Herkunftsort, sprich Herkunftsorgan, der Makrophagen für ihr unterschiedliches Verhalten in ein und demselben Organismus maßgeblich war. Die iNOS-Genexpression und NO-Produktion wurden z.B. in Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen durch LPS unterschiedlich aktiviert, was auf eine jeweils unterschiedliche, zelleigene funktionelle Bedeutung hinweist (Wang et al., 1999). Zudem handelt es sich bei der PCR und dem Immunoblot um zwei unterschiedliche methodische Ansätze mit jeweils unterschiedlicher Sensitivität, soweit ein direkter Vergleich überhaupt sinnvoll ist. Mit Hilfe der PCR vermag man im Allgemeinen bereits sehr geringe Mengen an mRNA nachzuweisen, während die ihr entsprechende Proteinmenge unter Umständen unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze liegen kann.

Die zwanzigstündige LPS-Exposition der Alveolarmakrophagen rief in unserer Versuchsreihe eine merkliche Akkumulation der iNOS-mRNA hervor. Zusätzlich zu diesem bekannten Effekt auf Transkriptionsebene werden der Expression der iNOS auch posttranskriptionelle und posttranslationelle Ereignisse zugeschrieben. Weiss und Mitarbeiter beobachteten mitunter, dass LPS nicht nur die Transkription von iNOS förderte, sondern dass es zusätzlich die Halbwertszeit der iNOS-mRNA und somit ihre Stabilität um ca. das Vierfache verlängerte, so dass die Enzymsynthese in größerem Ausmaß gewährleistet war (Weiss et al., 1994). Des Weiteren wurde beobachtet, dass posttranskriptionell die Translation der bereits stabilen mRNA

ebenfalls moduliert werden kann. Selbst das fertige Protein kann entsprechend der aktuellen zellulären Situation aktiv im Rahmen eines posttranslationalen Mechanismus degradiert und funktionell ausgeschaltet werden (Kolodziejcki et al., 2004; Walker et al., 1997). Hammermann et al. 2000 und Geller et al. 1993 stellten in diesem Zusammenhang fest, dass Proteinsynthese-Inhibitoren den Anstieg der iNOS-Aktivität durch LPS oder Zytokine zu verhindern vermochten, was im Umkehrschluss ein weiteres Indiz für die primäre Förderung der de-novo-Synthese entsprechender Enzyme als Antwort auf induktive Stimuli liefert.

Zusammenfassend unter Berücksichtigung der zitierten Untersuchungen legt der von uns festgestellte LPS-vermittelte Anstieg der Transkriptionsrate der iNOS und der Arginasen die Vermutung nahe, dass eine erhöhte LPS-induzierte iNOS- und Arginasen-Aktivität in Alveolarmakrophagen der Ratte mit folglich erhöhter NO- und Harnstoffbildung durch eine erhöhte Gen-Expression und konsekutive Neu-Synthese des iNOS- bzw. Arginase-Proteins bewerkstelligt wird. Ergänzend kann man an dieser Stelle noch einbringen, dass die Arginasen-Aktivität zeitlich versetzt zu der iNOS-Aktivität eintritt, was sich ebenfalls in der vergleichsweise verzögert induzierten pulmonalen Arginasen-mRNA nach LPS-Exposition von Wistar- oder Sprague-Dawley-Ratten widerspiegelt (Klasen et al., 2001; Boucher et al., 1999; Sonoki et al., 1997).

II. Enzymatische Aktivität, Induzierbarkeit und Expressionsmuster von iNOS, Arginase I und II unter OA

Okadeinsäure vermag zeitabhängig die Aktivität von iNOS, Arginase I und II signifikant zu steigern

Die zwanzigstündige Anwesenheit von 10, 30 und 100 nM Okadeinsäure wirkte sich auf die iNOS und die Arginase signifikant aktivierend aus mit entsprechendem graduellen Anstieg der Nitrit- und Harnstoffkonzentration. Zwischenbilanzierend ließ sich zu diesem Zeitpunkt sagen, dass LPS und der selektive Phosphatasen-Inhibitor Okadeinsäure hinsichtlich ihrer Wirkung gleichgerichtet agieren im Sinne einer Aktivitätszunahme, und dass Phosphatasenaktivität in Alveolarmakrophagen der Ratte mit großer Wahrscheinlichkeit einen allgemein supprimierenden Effekt auf die iNOS zur Folge hat. Verkürzte man die Einwirkzeit der Okadeinsäure wiederum auf

1h, so konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Kontrollzellen und den Okadeinsäure-behandelten Zellen bzgl. ihrer enzymatischen Aktivität in der Nitrit- und Harnstoffbildung festgestellt werden. In der Literatur wurde zwar eine Regulation der NO-Synthase unmittelbar auf Aktivitätsebene mittels enzymatischer De/Phosphorylierung beschrieben, doch wurden die Daten an neuronalen und endothelialen Zellen erhoben und bezogen sich auf nNOS und eNOS (Corson et al., 1993; Michel et al., 1993; Nakane et al., 1991). Gegenargumentativ könnte man die spärliche Präsenz der iNOS bereits unter Normalbedingungen in der Zelle aufführen, so dass eine evtl. vorhandene Okadeinsäure-bedingte Verhinderung einer direkt-enzymatischen Dephosphorylierung der iNOS mit deren zeitnahen enzymaktivierenden Auswirkungen aufgrund des vorherrschenden quantitativen Enzymmangels mit unseren Methoden ohnehin nicht nachweisbar wären. Am wahrscheinlichsten aber sind die Okadeinsäure-sensitiven Phosphatasen 1 α , 1 β , 1 γ und 2 für direkt enzymatische Prozesse der iNOS in Alveolarmakrophagen der Ratte nicht zuständig, da auch die sonst so eng damit verknüpfte und konstitutiv exprimierte Arginase ebenfalls keinen Aktivitätsanstieg innerhalb 1 h aufwies, wohl aber nach 20h. Überdies dürfen Beobachtungen über die Regulation der konstitutiven NOS-Isoenzyme nicht ohne weiteres auf die induzierbare Form übertragen werden, da selbst unter ersteren Unterschiede bestehen: so bringt eine direkte Phosphorylierung der nNOS eine Aktivitätsregredienz mit sich, während der gleiche Mechanismus für die eNOS eine Aktivitätszunahme hervorruft (Boo et al., 2002; Dinerman et al., 1994). Ähnlich wie unter der Wirkung von LPS vermutet man hinter den Aktivitätsanstiegen der jeweiligen Enzyme unter Okadeinsäure-Wirkung Änderungen, die sich vorrangig auf Expressionsebene abspielen.

Inhibitoren von PP 1 und PP 2 können die mRNA-Expression von iNOS, Arginase I und II effektiv stimulieren

Tatsächlich wurde die verzeichnete Aktivitätssteigerung der funktionellen Versuche auch auf Expressionsebene, bzw. zunächst auf Transkriptionsebene im engeren Sinne, bestätigt. Durch die zwanzigstündige Einwirkung von Okadeinsäure konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA für iNOS, Arginase I und II herbeigeführt werden. Somit war die signifikant erhöhte iNOS- und Arginase-Aktivität als Antwort auf die Okadeinsäure vornehmlich die Konsequenz einer erhöhten Gentranskription. Hierbei muss vor Auge geführt werden, dass der Phosphatase-Inhibitor Okadeinsäure kein

Stimulans im eigentlichen Sinne ist, wie z.B. das Endotoxin LPS, welches für die Zelle eine bakterielle Infektion signalisiert und somit ein viel potenteres immunogenes Mittel darstellt. Die Effekte der Okadeinsäure basieren vielmehr auf der Aufhebung der Wirkung von Mechanismen, welche in ihrer Gesamtheit das Aktivitätsniveau spezieller Enzyme bestimmen. Darauf wird ebenso die größenordnungsmäßig halb so starke Aktivitätserhöhung der iNOS und der Arginase unter der Wirkung von Okadeinsäure im Vergleich zu LPS zurückgeführt, die als immunogene Bestandteile mit chemotaktischen Eigenschaften zusätzliche Verstärkungsmechanismen initiieren. Geht man von sog. Normalbedingungen aus, so herrscht in der Zelle ein dynamisches Gleichgewicht, welches die Summe zahlreicher, teils konkurrierender Reaktionen widerspiegelt und kontinuierlich an die aktuellen äußeren Bedingungen adaptiert wird. Setzt man gezielt einen Regulationsmechanismus außer Kraft, z.B. die enzymatische Dephosphorylierung mittels Okadeinsäure, so resultiert daraus zunächst unweigerlich ein vorläufiges Ungleichgewicht der abhängigen Reaktionen. Die Tatsache, dass die Okadeinsäure ein hinreichend potenter und selektiver PP 2- und PP 1-Hemmer ist (Wera & Hemmings, 1995), und die Informationen unserer Ergebnisse, welche nach Applikation dieses Phosphatase-Inhibitors eine signifikante Expressionssteigerung der iNOS, Arginase I und II dokumentierten, führen zu der Schlussfolgerung, dass PP 1 und PP 2 gewöhnlich mittels Dephosphorylierung als Expressionssuppressoren der genannten Enzyme in Alveolarmakrophagen der Ratte fungieren, indem sie eine negative Kontrolle über die iNOS- und Arginasen-Gentranskription ausüben. Es wird angenommen, dass eine verstärkte Dephosphorylierung die bereits durch Kinasen aktivierten Signalkaskaden wieder in ihren inaktiven Zustand überführt und so ihre Auswirkungen ausschaltet bzw. abschwächt (Fujiki & Suganuma, 1993). So kommen die Auswirkungen der Serin/Threonin-Phosphatase-Aktivität vornehmlich auf Expressionsebene zum Tragen und wirken einer durch basal aktive Kinasen in Gang gesetzten de-novo-Synthese der iNOS-, Arginase I- und II-Proteine entgegen.

III. Proteinexpression von iNOS und Arginase I

Die Regulation von iNOS, Arginase I und II durch die Phosphatasen 1 α , 1 β , 1 γ und 2 ist eine Leistung der Zelle auf Expressionsebene mit Protein-Neusynthese

Die beobachtete Akkumulation der iNOS- und Arginasen-mRNA war zweifellos die

Konsequenz einer erhöhten Gentranskription. Zum vollständigen Prozess der Expression eines Gens gehört die der Transkription folgende Proteinsynthese. Nicht immer jedoch korrelieren der festgestellte zytosolische mRNA-Gehalt und seine Änderungen im Verlauf mit dem jeweiligen aktuellen Protein-Gehalt und dessen Schwankungen (Jesch et al., 1997). Zahlreiche Kontrollmechanismen sind während des gesamten Expressionsvorgangs zwischen den einzelnen Schritten geschaltet, so dass es sich empfiehlt, die sensitiveren mRNA-Untersuchungen möglichst durch anschließende Proteinanalysen abzurunden und zu erhärten. Der Nachweis der Enzym-Expression durch Western-Blot-Analyse läßt die Beobachtung von Einflüssen auf den Induktions- und Expressionsmechanismus des Enzyms, nicht aber Schlussfolgerungen über dessen Aktivität unter den gegebenen Bedingungen zu. Nur in Kombination mit zusätzlichen funktionellen Untersuchungen sind differenziertere Aussagen zulässig. Die bereits erwähnte unterschiedliche Sensitivität des PCR- und des Immunoblotverfahrens erklärt auch, dass bei nachweisbarer mRNA der zugehörige Proteingehalt unterhalb der Nachweisgrenze liegen mag. Vor diesem Hintergrund haben Jesch et al. 1997 beispielsweise bei Experimenten an Ratten-Alveolarmakrophagen mitunter beobachtet, dass während die Expression des iNOS-Proteins nur in stimulierten Alveolarmakrophagen detektierbar war, die Expression der iNOS-mRNA sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen vorkam (Jesch et al., 1997). Neben der unterschiedlichen Sensitivität der Detektionsmethoden können natürlich auch posttranskriptionelle und translationelle Ereignisse für eine Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteingehalt verantwortlich sein.

Insgesamt bekräftigen die Immunoblot-Analysen in Verbindung mit den PCR-Daten und den funktionellen Ergebnissen das Postulat, dass eine erhöhte Okadeinsäure-getriggerte iNOS- und Arginase-Aktivität in Ratten-Alveolarmakrophagen mittels erhöhter Gen-Expression und konsekutiver de-novo-Synthese des iNOS- bzw. Arginase-Enzyms erreicht wird. Folglich scheint die Funktion der Phosphatasen 1 und 2 in der Antagonisierung fördernder Effekte auf die Expression der o.g. Enzyme zu bestehen. So besitzen diese Okadeinsäure-empfindlichen Phosphatasen eine negative Kontrollfunktion bei der Regulation der argininabhängigen Stoffwechselwege, indem sie offenbar eine Unterdrückung der für die iNOS, Arginase I und II zuständigen Gene verursachen. Dabei stehen sie nach wie vor in

einem ständigen Wechselspiel mit den dazugehörigen Kinasen (Schönthal, 1998), worin die individuelle, schwankende Netto-Expression der NO-Synthasen und Arginasen ihren Ursprung hat.

IV. Auswirkungen von OA auf die Zellintegrität

Zelladhäsivität und –Stoffwechsel werden durch OA dosisabhängig negativ beeinflusst

Die Proteinbestimmungen in Kombination mit der Vitalitätsuntersuchung der Kulturzellen bei 100 nM Okadeinsäure ergaben insgesamt eine erhaltene Zellvitalität bei eingeschränkter Zelladhäsivität. Die verminderte Zelladhäsivität entpuppte sich im abrupten Proteinabfall bei 100 nM nach einer intensiven protokollgemäßen Waschprozedur durch eine zweite unabhängige Arbeitsgruppe im Rahmen ihrer Experimente, während sich der Zellstoffwechsel bei derselben Konzentration als absolut intakt erwies. Aus diesem Grunde ist eine zytotoxische Wirkung der Okadeinsäure bei einer Konzentration von 100 nM eher unwahrscheinlich. Arginase-Assays, welche jedoch in einer zweiten Versuchsserie bei einer Okadeinsäure-Konzentration von 300 und 1000 nM durchgeführt wurden, fielen durch eine deutliche Aktivitätsreduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen auf, was Ausdruck einer beginnenden Zytotoxizität sein könnte (Ten-Hage et al., 2000). Resümierend lässt sich sagen, dass Okadeinsäure beginnend bei einer Dosis von 100 nM zunächst Auswirkungen auf Zelladhäsivitätsmechanismen hat, während sie mit steigender Konzentration den Zellmetabolismus zunehmend beeinträchtigt und nach Überschreiten eines zellspezifischen Schwellenwertes toxisch ist.

V. Serin/Threonin-Phosphatasen

Proteinphosphatasen, welche für Phosphoserin- und Threoninreste spezifisch sind, kommen praktisch in allen Aspekten der zellulären Regulation vor. Ihre Beteiligung an nukleären Geschehen ergab sich bald in Studien unterschiedlicher Thematik, was ihr ubiquitäres Vorkommen verrät (Thénevin et al., 1997). In der Tat existieren sehr viele Proteinphosphatasen, welche oft duale Eigenschaften, abhängig von der Zellart und den Umgebungsbedingungen, demonstrieren (Schönthal, 1998).

Aufgrund der unterschiedlichen IC_{50} -Werte der zwei am meisten verbreiteten Phosphatasen PP 1 (IC_{50} : 20-100 nM) und PP 2 (IC_{50} : 0,1-1,0 nM) werden zelluläre Effekte, welche bei höheren Okadeinsäure-Konzentrationen beobachtet werden, im Allgemeinen der Hemmung von PP 1 zugeschrieben (Schönthal, 1992). Man sollte jedoch im Auge behalten, dass bei niedrigen Okadeinsäure-Konzentrationen auch andere in den Zellen weniger vertretene Phosphatasen wie z.B. PP 4 (IC_{50} : 0,2 nM) und PP 5 (IC_{50} : < 1,0 nM) inhibiert werden. Nichtsdestotrotz existieren signifikante Schwankungen unter den publizierten IC_{50} -Werten, welche aus Messungen stammen, die in vitro vorgenommen wurden, d.h. an Zelllysaten oder an gereinigten Enzymen. Wenn man die Rolle der Phosphatasen bei der Signaltransduktion und Genregulation an Zellkulturen untersucht, so liegen die effektiven Konzentrationen signifikant höher. Überhaupt dürfen die o.g. IC_{50} -Werte nur bedingt auf Zellkultur-Bedingungen übertragen werden (Schönthal, 1998). So liegt z.B. der veröffentlichte IC_{50} -Wert der Okadeinsäure für die Phosphatase 2 in gereinigten Enzymen bei 1 nM, während er in Zellkulturen mitunter 30 nM bis 1 μ M betrug (Favre et al., 1997; Cohen et al., 1989). Ferner stehen evtl. noch weitere Phosphatasen dieser Familie in Aussicht (Chen et al., 1992), weshalb unsere Beobachtungen im Zusammenhang mit der Okadeinsäure unter dem Vorbehalt evaluiert werden müssen, daß bisher noch undetektierte Phosphatasen ebenfalls zu der registrierten Wirkung beitragen könnten. Eine Kombination verschiedener Phosphatase-Inhibitoren, welche sich in ihrer Spezifität unterscheiden, könnte eine strengere Zuordnung der Effekte zu den entsprechenden Phosphatasen erlauben.

Ein weiterer Punkt, den es bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen gilt, ist die Tatsache, dass bis dato kein sicherer Ausschluss unspezifischer Nebenreaktionen, sog. pleiotroper Effekte, der Okadeinsäure in der Zelle existiert. Zwar gehört die Okadeinsäure zu den intensivst studierten Testsubstanzen, welche bisher keine weiteren zellulären Ziele als die erwähnten Phosphatasen aufwies, aber es besteht weiterhin die Möglichkeit von Interaktionen mit anderen bisher noch nicht identifizierten Nicht-Phosphatase-Substraten, zumal Phosphatase-Inhibitoren dualen Charakter haben (Schönthal, 1998). Insbesondere könnten die von uns beobachteten Effekte der Okadeinsäure zusätzlich einer direkt regulatorischen Wirkung auf intrazelluläre Kinasen entspringen, deren katalytische Aktivität durch reversible Phosphorylierung reguliert und folglich durch die Abwesenheit der sonst

hemmenden Phosphatasen-Aktivität stimuliert würde (Wera & Hemmings, 1995).

Auch die Expression der Phosphatasen selbst unter unterschiedlichen Bedingungen bedarf intensiverer Untersuchungen. Offenbar wird einer experimentell intendierten erhöhten PP 2-mRNA-Expression durch Transfektion des entsprechenden Vektors in Säugetierzellen mittels eines potenten autoregulatorischen Mechanismus auf Proteinsynthese-Ebene entgegengearbeitet, so dass der PP 2-Proteingehalt konstant bleibt (Baharians & Schönthal, 1998; Kam et al., 1997; Kakinoki et al., 1992). Dies könnte vielleicht auch unsere Beobachtungen bzgl. der Testsubstanz-unabhängigen quantitativ konstanten Expression von PP 1 und PP 2 beleuchten.

VI. Die Kettenreaktion der Zellaktivierung

Zahlreichen Signalkaskaden liegt ein gemeinsames Merkmal zugrunde: die Änderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren mittels reversibler Phosphorylierung oder Dephosphorylierung. Dadurch werden ihre intrazelluläre Lokalisation oder ihre DNA-bindenden Eigenschaften kontrolliert. Einer der Transkriptionsfaktoren, die im Rahmen der iNOS und Arginasen-Transkription aktiviert werden, ist der nukleäre Faktor Kappa B (NF- κ B) (Klasen et al., 2001; Hammermann et al., 2000). Seine Aktivierung erfordert die Degradierung von den intrazellulären Protein-Inhibitoren I κ B- α und I κ B- β , was mittels Hyperphosphorylierung dieser Proteine bewerkstelligt wird (Thénevin et al., 1990). Umgekehrt würde ihre Dephosphorylierung eine Aktivitätsminderung von NF- κ B verursachen. Okadeinsäure vermag mittels Hemmung der Phosphatasen, welche durch Dephosphorylierung Komponenten des Signaltransduktionsweges (in-) aktivieren, denselben Effekt herbeiführen wie die entsprechenden Proteinkinasen (Sassa et al., 1989) und so selbst die Aktivierung oder Hemmung spezifischer Gene bewirken (Schönthal, 1995). Ob die von uns beobachteten Phosphatasen in direkter Weise auf o.g. nukleäre Faktoren wirken oder eher indirekt an einer in der Ereigniskette der Signalkaskade weiter stromaufwärts oder abwärts liegenden Stelle zum Einsatz kommen, kann man anhand unserer Untersuchungen nicht feststellen.

Im Falle der iNOS ist jedenfalls die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und

seine notwendige, wenn auch nicht hinreichende, Rolle bei der Induktion der NO Synthase eingehend beschrieben worden (Hammermann et al., 2000; Xie et al., 1994). In Hinsicht auf die Arginase liegen diesbezüglich weniger, zum Teil widersprüchliche, Informationen vor (Wang et al., 1995), jüngere Berichte aber (Klasen et al., 2001), die sich speziell auf Ratten-Alveolarmakrophagen beziehen, deuten auf eine die iNOS-Hochregulation begleitende Induktion der Arginase über einen zumindest teilweise gemeinsamen transkriptionellen Mechanismus mit Beteiligung des Faktors NF- κ B hin. Des Weiteren stellten Klasen et al. 2001 fest, dass die Arginase für ihre Aktivierung evtl. zusätzliche de-novo-synthetisierte Transkriptionsfaktoren benötigte, was sich möglicherweise ebenfalls im fehlenden Wirkungseintritt nach der einstündigen LPS-Behandlung in den funktionellen Versuchen und in der verzögerten Transkription in den PCR-Versuchen niederschlägt. In Gegenüberstellung dazu befand sich unter den gleichen Versuchsbedingungen sowohl die Aktivität der iNOS in unseren Versuchen als auch ihre Transkription bei Klasen et al. 2001 oberhalb des signifikanten Niveaus mit nachfolgender hochsignifikanter Entwicklung im zeitlichen Verlauf, d.h. nach weiterer LPS-Einwirkzeit, was ebenfalls eine primäre iNOS-Regulation auf Expressionsebene vermuten lässt und gleichzeitig das rasche Einsetzen des induktiven Effektes, das für eine hauptsächlich NF- κ B-vermittelte Reaktion kennzeichnend ist, deutlich zum Ausdruck bringt, da der bekanntlich bereits unter Normalbedingungen im Zytosol vorliegende Transkriptionsfaktor lediglich durch Abspaltung der inhibierenden Untereinheiten aktiviert wird und somit keine vorgeschaltete Proteinbiosynthese erforderlich ist (Baeurle & Baltimore, 1996).

VII. Pathophysiologische Konsequenzen der Phosphatasen für die iNOS-, Arginase I- und II-Funktion

Basierend auf der Eigenschaft der iNOS und insbesondere der Arginase, die Generierung von NO, Polyaminen und Kollagen zu regulieren und auf diese Weise Prozesse wie Atemwegstonus, Zellhyperplasie und Kollagendeposition zu beeinflussen (Waddington et al., 1998), liefern die Ergebnisse dieser Arbeit in Ergänzung zu bereits existenten Veröffentlichungen und themenverwandten Untersuchungen die Grundlage für mögliche pharmakologische Beeinflussungsziele im Argininmetabolismus durch therapeutische Intervention mit geeigneten Agenzien

in den abhängigen Stoffwechselwegen, insbesondere vor dem Hintergrund atopisch bedingter Funktionsstörungen des Respirationstraktes.

Die enge funktionelle Beziehung zwischen der iNOS und der Arginase legt nahe, dass ihre Regulation durch die Phosphatasen ebenfalls in enger Verknüpfung geschieht. Aufgrund ihrer nachweislichen immunologischen Relevanz, v.a. in prolongierten und dysregulierten Entzündungsgeschehen, ist die Regulation beider Enzyme von enormer Bedeutung. Selbst die Adhäsionseigenschaften von Alveolarmakrophagen werden unseren Versuchsergebnissen zugrunde durch die Phosphatasen mitbeeinflusst, vermutlich durch Beteiligung an der Regulation von involvierten Adhäsionsproteinen. Was die Funktion der Arginase betrifft, kommt diese einerseits mittelbar im frühen Immungeschehen zur Geltung, indem sie die lokale Argininverfügbarkeit während der Angriffsphase der Entzündung limitiert, andererseits unmittelbar in der darauffolgenden Erholungsphase durch Unterstützung der Wundheilung und des sog. Gewebs-Remodellings bzw. Gewebswiederaufbaus (Ochoa et al., 2000; Morris, 1999). Das abgestimmte Zusammenspiel zwischen Alveolarmakrophagen und umgebendem Lungengewebe zeigt sich exemplarisch in ihrer anatomischen Nachbarschaft und im sich ergänzenden Antwortverhalten in der Entzündungssituation. Die mRNA-Analyse u.a. für Arginase I in der Lunge allergenexponierter Mäuse offenbarte beispielsweise eine merkliche Induktion der Arginase I-mRNA, wobei Alveolarmakrophagen diese in besonderem Maße zu exprimieren schienen (Zimmermann et al., 2003). Auf der anderen Seite stellt das angrenzende Epithel bekanntlich eine Hauptquelle des dazugehörigen Substrats L-Arginin dar (Hoet & Nemery, 2000). Somit werden die Intermediate L-Ornithin und Prolin, welche von Arginase exprimierenden Zellen z.B. Makrophagen extrazellulär sezerniert werden, in Fibroblasten transportiert und anschließend in das von ihnen gebildete Kollagen inkorporiert. Offenbar wird die biologische Funktion von Alveolarepithel, Makrophagen und Fibroblasten zusätzlich durch ihre nachbarschaftliche Lokalisation insbesondere peribronchial begünstigt (Zimmermann et al., 2003; Albina et al., 1993). Wie die NO-Synthase besitzt auch die Arginase duale Eigenschaften, die praktisch für jede Komponente des Immunsystems charakteristisch sind und beim Ablauf der Immunantworten von Belang sind. Aus diesem Grunde ist bei der Beurteilung ihrer Wirkung sowie die der iNOS eine Differenzierung zwischen Akutgeschehen und chronischem Prozess

notwendig. So erweist sich ihr entzündungsinduziertes, aggressives Verhalten in der Frühphase der Entzündung zwecks Eliminierung der aktuellen Bedrohung durch Noxen unterschiedlicher Natur als sinnvoll, während eine langwierige, schwelende Gewebsreizung mit konsekutiven lokalen Remodelling-Vorgängen, insbesondere in den Atemwegen, negative, irreversible Langzeitfolgen mit Funktionsverlust birgt.

Wenn die Phosphatasen 1 α , β , γ und PP 2 tatsächlich an der basalen, konstitutiven Expression der Arginasen sowie der unter physiologischen Bedingungen basal geringen iNOS-Expression beteiligt sind, und man im Falle chronisch entzündlicher Prozesse von einem pathologisch veränderten Basalniveau der Expression und Aktivität der involvierten Enzyme ausgeht (Meurs et al., 2003; Kharitonov & Barnes, 2001), so stellen die Phosphatasen in mittelbarer oder unmittelbarer Weise ein wichtiges experimentelles und zukünftig evtl. pharmakologisches Manipulationsziel dar.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Durch das gemeinsame Substrat L-Arginin sind die NO-Synthase und die Arginase biochemisch miteinander verbunden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Regulation beider Stoffwechselwege, sowohl auf der funktionellen Ebene der Enzymaktivität als auch auf mRNA- und Proteinexpressionsebene. Insbesondere unter dem Aspekt der reversiblen Phosphorylierung und Dephosphorylierung, mit dem Interessenschwerpunkt auf den weniger untersuchten Arginasen liegend, war man bestrebt, evtl. vorhandene wechselseitige Regulationsmechanismen zwischen iNOS und Arginase I und II auf Expressions- und Enzymaktivitätsebene zu ermitteln. Unter Zuhilfenahme von Proteinphosphatase-Inhibitoren als Testsubstanz analysierte man mittels RT-PCR und des Immunoblotverfahrens Änderungen des Expressionsmusters der iNOS und der Arginase-Isoenzyme, um mögliche Auswirkungen einer (De)phosphorylierung auf mRNA- bzw. auf Proteinebene zu erfassen. Spezifische Enzym-Assays mit den gleichen Testsubstanzen lieferten ergänzende Informationen über den jeweiligen Aktivitätszustand der entsprechenden Enzyme.

Unsere Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Arginasen I und II werden in Alveolarmakrophagen der Ratte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konstitutiv nebeneinander exprimiert und weisen eine basale Enzymaktivität auf.
- iNOS wird unter Normalbedingungen nicht oder nur geringfügig exprimiert.
- LPS ist ein effektiver Induktor der iNOS, Arginase I und II primär über eine Hochregulation ihrer Gen-Expression mit vermehrter mRNA- und konsekutiver Protein-Neusynthese, welche mit gesteigerter Gesamtaktivität der Enzyme einhergeht.
- Die LPS-bedingte Induktion der Arginase I und II geschieht in zeitlicher Verzögerung zur Hochregulation der iNOS.
- Die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen 1α , 1β , 1γ und PP 2 werden in Alveolarmakrophagen der Ratte konstitutiv exprimiert, deren Expressionsmuster wird aber durch LPS nicht beeinflusst.

- Inhibitoren der Proteinphosphatasen 1 und 2 vermögen über eine gesteigerte mRNA- und Protein-Neusynthese von iNOS, Arginase I und II ihre Aktivität effektiv zu erhöhen.
- Der Inhibitor der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen 1α , 1β , 1γ und PP 2 Okadeinsäure ist ein wirkungsschwächerer Induktor der Arginase I, II und iNOS als LPS.
- Der selektive Phosphatase 1- und 2-Inhibitor Okadeinsäure beeinträchtigt in höheren, jedoch noch metabolisch stimulierenden Konzentrationen die Zelladhäsivität, während er ab Konzentrationen von 300 nM auch die Aktivität der iNOS-, Arginase I- und II signifikant reduziert.

LITERATUR

- Adler KB, Fischer BM, Li H, Choe NH, Wright DT.** Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 526-530
- Albina JE, Abate JA, Mastrofrancesco B.** Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *J Surg Res* 1993; 55: 97-102
- Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM.** Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-1370
- Ashutosh K.** Nitric oxide and asthma: a review. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6: 21-25
- Baeuerle PA, Baltimore D.** NF- κ B: Ten years and beyond. *Cell* 1996; 87: 13-20
- Baharians Z, Schönthal AH.** Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 19019-19024
- Bandaletova T, Brouet I, Bartsch H, Sugimura T, Esumi H, Ohshima H.** Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with propionibacterium-acnes and lipopolysaccharide. *APMIS* 1993; 101: 330-336
- Barbul A.** Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parent Enteral Nutr* 1986; 10: 227-238
- Barnes PJ, Belvisi MG.** Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48: 1034-1043
- Bellinghieri G, Santoro D, Mallamace A, Savica V.** L-arginine: a new opportunity in the management of clinical derangements in dialysis patients. *J Ren Nutr.* 2006; 16: 245-247.
- Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ.** Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992; 210: 221-222
- Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H.** Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1819-1828
- Boucher JL, Moali C, Tenu JP.** Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1015-1028
- Bousquet J.** From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Crit Care Med* 2000; 161: 1720-1745
- Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L.** Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 1995; 155: 2077-2084
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-718
- Brüne B, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S.** Spermine prevents endonuclease activation and apoptosis in thymocytes. *Exp Cell Res* 1991; 195: 323-329
- Busse WW, Lemanske RF Jr.** Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344: 350-362
- Cai H, Szeberenyi J, Cooper GM.** Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 5314-5323

- Carraway MS, Piantadosi CA, Jenkinson CP, Huang YC.** Differential expression of arginase and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res* 1998; 24: 253-268
- Chang C, Liao JC, Kuo L.** Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 1998; 43: H342-H348
- Chen MX, Chen YH, Cohen PTW.** Polymerase chain reactions using *Saccharomyces*, *Drosophila* and human DNA predict larger family of protein serin/threonine phosphatases. *FEBS Lett* 1992; 306: 54-58
- Clowes GHA, Randall HAT, Cha CJ.** Amino Acid metabolism in septic and traumatized patients. *J Parenter Enteral Nutr* 1980; 4: 195-205
- Cohen P, Klumpp S, Schelling DL.** An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 1989; 250: 596-600
- Cook HT, Jansen A, Lewis S, Largen P, O'Donnell M, Reaveley D, Cattell V.** Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: interaction between nitric oxide synthase and arginase. *Am J Physiol* 1994; 267: F646-F653
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modollel M.** Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10, and PGE₂) in murine bone marrow derived macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 206: 667-673
- MA Corson, NL James, SE Latta, RM Nerem, BC Berk, DG Harrison.** Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984-991
- Currie GA, Gyure L, Cifuentes L.** Microenvironmental arginine depletion by macrophages in vivo. *Br J Cancer* 1979; 613-620
- Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH.** Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1245-1251
- Ding M, Zhang M, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Voskuhl RR.** Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol* 1998; 160: 2560-2564
- Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J.** Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA, tissue-specific regulation and induction by cytokines. *J Biol Chem* 1996; 271: 27814-27817
- Ellis JL, Udem BJ.** Inhibition by L-N^G-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airways. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1543-1547
- Favre B, Turowski B, Hemmings A.** Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem* 1997; 272: 13856-13863
- Filep JG, Battistini B, Sirois P.** Induction by endothelin-1 of epithelium-dependent relaxation of guinea-pig trachea in vitro: role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 637-644
- Fischer A, Mayer B, Kummer W.** Nitric oxide synthase in vagal sensory and sympathetic neurons innervating the guinea pig trachea. *J Auton Nerv Syst* 1996; 56: 157-160

- Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H.** Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1321-1332
- Fujiki H, Suganuma M.** Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res* 1993; 61: 143-194
- Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, DiSilvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR.** Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3491-3495
- Glass RD, Knox WE.** Arginase isozymes of rat mammary gland, liver and other tissues. *J Biol Chem* 1973; 248: 5785-5789
- Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT.** Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* 1990; 85: 264-273
- Griffith OW, Stuehr DJ.** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 707-736
- Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA.** Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G315-G321
- Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD.** Human arginase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1987; 13: 181-214
- Grody WW, Argyle C, Kern RM, Dizikes GJ, Spector EB, Strickland AD, Klein D, Cederbaum SD.** Differential expression of the human arginase II genes in hyperargininemia: enzymatic pathologic and molecular analysis. *J Clin Invest* 1989; 602-609
- Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FBJM, Erzurum SC.** Continuous nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7809-7813
- Hammermann R, Messeri-Dreissig D, Mossner J, Fuhrmann M, Berrino L, Gothert M, Racke K.** Nuclear factor kappaB mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1294-1302
- Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Racke K.** Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett.* 1995; 359: 251-4
- Heldin SG.** Eine Methode das Lysin zu isolieren, nebst einigen Bemerkungen über das Lysatinin. *Z Physiol Chem* 1895; 21: 297-305
- Hey C, Boucher JL, Verdon-Le Goff FVL, Ketterer G, Wessler I, Racké K.** Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N^ω-hydroxy-D,L-inospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 395-400
- Hey C, Wessler I, Racké K.** Nitric oxide synthase activity is inducible in rat, but not in rabbit alveolar macrophages, with a concomitant reduction in arginase activity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; 351: 651-659

- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM.** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94
- Hoet PH, Nemery B.** Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol* 2000; 278: L417-L433
- Hogman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G.** Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Eur Respir J* 1993; 6: 177-180
- Hrabák A, Bajor T, Ágnes Temesi, Mészáros G.** The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase. *FEBS Lett* 1996; 390: 203-206
- Hunter T.** Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* 1995; 80: 225-236
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrus 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
- Ignarro L, Murad F.** Nitric oxide: biochemistry, molecular biology and therapeutic implications. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 1-516
- Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, Grody WW, Cederbaum S.** The human arginases and arginase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 86-100
- Janne J, Alhonen L, Leinonen P.** Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med* 1991; 23: 241-259
- Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH.** Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 83-88
- Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD.** Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol* 1996; 114B: 107-132
- Jesch NK, Dorger M, Enders G, Rieder G, Vogelmeier C, Messmer K, Krombach F.** Expression of inducible nitric oxide synthase and formation of nitric oxide by alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1297-300
- Kakinoki Y, Kitamura K, Matsuzawa S, Mizuno Y, Miyazaki T, Kikuchi K.** Gene expression and activities of protein phosphatases PP1 and PP2A in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 291-297
- Kam E, Nirunsuksiri W, Hager B, Fleckman P, Dale BA.** Protein phosphatase activity in human keratinocytes cultured from normal epidermis and epidermis for patients with harlequin ichthyosis. *Br J Dermatol* 1997; 137: 874-882
- Kharitonov SA, Barnes PJ.** Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1693-1722
- Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J, Racké K.** Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1349-1357
- Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258

- Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS.** Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-377
- Kolodziejwski PJ, Koo JS, Eissa NT.** Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18141-18146
- Kossel A, Dakin HD.** Über die Arginase. *Z Physiol Chem* 1904; 41: 321-331
- Krebs HA, Henseleit H.** Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z Physiol Chem* 1932; 210: 33-66
- Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Pfeilschifter J.** Molecular mechanisms of dexamethason inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 β -stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 255-259
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, 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
- Lamas S, Michel T.** Molecular biological features of nitric oxide synthase isoforms. *Nitric oxide and the lung* (Zapol WM, Bloch KD, eds. New York) 1997; 1-57
- Lewis B, Langkamp-Henken B.** Arginine enhances in vivo immune responses in young, adult and aged mice. *J Nutr* 2000; 130: 1827-1830
- Lindemann D, Racké K.** Glucocorticoid inhibition of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) induced up-regulation of arginase in rat airway fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 386: 546-550
- Louis CA, Mody V, Henry WL Jr, Reichner JS, Albina JE.** Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1999; 276: R237-R242
- Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK.** Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 590-597
- MacMicking J, Xie Q-w, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-350
- Malandro MS, Kilberg MS.** Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 305-336
- Meurs H, Hamer MAM, Pethe S, Vadon-Le Goff S, Boucher JL, Zaagsma J.** Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1793-1798
- Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J.** Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 450-455
- Michel T, Li GK, Busconi L.** Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6252-6256

- Miles PR, Bowman L, Rengasamy A, Huffman L.** Constitutive nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1998; 274: L360-368
- Miura M, Yamauchi H, Ichinose M, Ohuchi Y, Kageyama N, Tomaki M, Endoh N, Shirato K.** Impairment of neural nitric oxide-mediated relaxation after antigen exposure in guinea pig airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 217-222
- Moncada S, Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012
- Moncada S, Higgs EA.** Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 13619-13630
- Morri M, Gotoh T.** Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr* 2004; 134: 2820-2825
- Morris SM Jr.** Arginine synthesis, metabolism and transport: regulators of nitric oxide synthesis. *Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide*, ed. by Laskin JD and Laskin DL. New York: Dekker, 1999; 57-85
- Morris SM Jr.** Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis. *Nitric Oxide* 2000; 187-197
- Mössner J, Hammermann R, Racké 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
- Nakane M, Mitchell J, Förstermann U, Murad F.** Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1396-1402
- Nathan C.** Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-2423
- Nathan C, Xie QW.** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 13725-13728
- Nathan CF, Hibbs JB Jr.** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 65-70
- Ochoa JB, Bernard AC, Mistry SK, Morris SM Jr, Figert PL, Maley ME, Tsuei BJ, Boulanger BR.** Trauma increases extrahepatic arginase activity. *Surgery* 2000; 127: 419-426
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526
- Persson M, Friberg SG, Hedqvist P, Gustafsson LE.** Endogenous nitric oxide counteracts antigen-induced bronchoconstriction. *Eur J Pharmacol* 1993; 249: R7-R8
- Peunova N, Enikopolov G.** Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 1993; 364: 450-453
- Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC.** Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 1998; 275: L96-L102
- Ricciardolo FLM.** Multiple roles of nitric oxide airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182
- 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* 199; E110-E117

- Sassa T, Richter WW, Uda N, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Fujiki H.** Apparent „activation“ of protein kinases by okadaic acid class tumor promoters. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 10: 1495-1498
- Schönthal AH.** Regulation of gene expression by serine/threonine protein phosphatases. *Sem Cancer Biol* 1995; 6: 239-248
- Schönthal A.** Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Front Biosci* 1998; 3: D1262-D1273
- Schulze E, Steiger E.** Über das Arginin. *Z Physiol Chem* 1886; 11: 43-65
- Sigma-Aldrich.** Lipopolysaccharide. *Biochemikalien und Reagenzien* 2004-2005; 1197.
- Sonoki T, Nagasaki A, Gotoh T, Takiguchi M, Takeya M, Matsuzaki H, Mori M.** Coinduction of nitric oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1997; 272: 3689-3693
- Tapiero H, Mathé G, Couvreur P, Tew KD. Dossier:** Free Amino Acids in human health and pathologies. I. Arginine. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 439-445
- Ten-Hage L, Delaunay N, Pichon V, Coute A, Puiseux-Dao S, Turquet J.** Okadaic Acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean). *Toxicon* 2000; 38: 1043-1054
- Thévenin C, Kim SJ, Rieckmann P, Fujiki H, Norcross MA, Sporn MB, Fauci AS, Kehrl JH.** Induction of nuclear factor-kappa B and the human immunodeficiency virus long terminal repeat by okadaic acid, a specific inhibitor of phosphatases 1 and 2A. *New Biologist* 1990; 2: 793-800
- Thomassen MJ, Kavuru MS.** Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1479-1490
- Trachtman H, Futterweit S, Singhal PC.** Nitric Oxide Modulates the Synthesis of Extracellular Matrix Proteins in Cultured Rat Mesangial Cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 207: 120-125
- Van Winkle LJ.** Endogenous amino acid transport systems and expression of mammalian amino acid transport proteins in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 157-172
- Waddington SN, Mosley K, Cook HT, Tam FWK, Cattell V.** Arginase I is upregulated in acute immune complex-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 247: 84-87
- Walker G, Pfeilschifter J, Kunz D.** Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1997; 272: 16679-16687
- Wang MJ, Jeng KC, Shih PC.** Differential expression of inducible nitric oxide synthase gene by alveolar and peritoneal macrophages in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice. *Immunology* 1999; 98: 497-503
- Wang WW, Jenkinson CP, Griscavage HT, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, Cederbaum SD, Ignarro LJ.** Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 1009-1016

- Ward JK, Barnes PJ, Springall DR, Abelli L, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Polak JM, Belvisi MG.** Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 175-184
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S.** Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5212-5216
- Weiss G, Goossen B, Doppler W, Fuchs D, Pantopoulos K, Werner-Felmayer G, Wachter H, Weisz A, Oguchi S, Cicatiello L, Esumi H.** Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 8324-8333
- Wera S, Hemmings B.** Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 1995; 311: 17-29
- Wu G, Morris SM Jr.** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336: 1-17
- Xie QW, Cho H, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C.** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225-228
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C.** Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-4708
- Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME.** Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 2003; 111: 1863-1874

DANKSAGUNG

Zu ganz besonderem Dank bin ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Kurt Racké für die hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeiten und der Anfertigung dieser Arbeit verpflichtet: für die Überlassung des Themas, die vielfältigen inhaltlichen Anregungen und vor allem seine ständige Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Meinem zweiten Gutachter danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn. Des weiteren danke ich Herrn Professor Dr. med. Alexander Pfeifer und seinem Vorgänger Herrn Professor Dr. Manfred Göthert für die Möglichkeit der Anfertigung einer Dissertation am von ihm geleiteten Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn.

Frau Rita Fuhrmann, Henn Dirk Lindemann, Herrn Gernot Brunn und Dr. Sonja Matthiesen möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass Sie mir während meiner Arbeit etliche Male mit Rat und Tat zur Seite standen und für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Auch allen weiteren Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts danke ich für die stets freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Für ihre großartige außerfachliche Unterstützung und ihren nicht zu ersetzenden Anteil an meiner Ausbildung möchte ich meinen Eltern danken. Sie haben durch ihre immerwährende liebevolle Förderung und Unterstützung zum Gelingen und Fertigstellen der Arbeit beigetragen.