

Wirkung von Poly-L-Kationen und Major Basic Protein auf die  
L-Argininaufnahme und die Stickstoffmonoxidsynthese in  
Alveolarmakrophagen der Ratte

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

Joachim Hirschmann  
aus Mönchengladbach

2009

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Racké

2. Gutachter: Prof. Dr. U. R. Juergens

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.09.2009

Aus

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Reuterstraße 2b  
53113 Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Dem Langmut und der nie verzagenden Zuversicht meiner Eltern und Katja gewidmet.



## Inhaltsverzeichnis

<u>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</u>	<u>7</u>
<u>1. Einleitung</u>	<u>8</u>
<u>1.1. Stoffwechselwege des L-Arginin</u>	<u>13</u>
<u>1.2. Die Stickstoffmonoxidsynthasen</u>	<u>14</u>
<u>1.2.1. Enzymstruktur und Reaktionsmechanismus</u>	<u>14</u>
<u>1.2.2. Kontrolle der Stickstoffmonoxidbildung</u>	<u>15</u>
<u>1.2.3. Hyperoxidanionen- und Peroxynitritbildung durch cNOS und iNOS</u>	<u>16</u>
<u>1.3. Transportmechanismen des iNOS-Substrates L-Arginin</u>	<u>17</u>
<u>1.3.1. Charakterisierung der Transportmechanismen für kationische Aminosäuren</u>	<u>17</u>
<u>1.3.2. Darstellung der verschiedenen Transportsysteme</u>	<u>18</u>
<u>1.3.2.1. Das <math>\gamma^+</math>-System</u>	<u>18</u>
<u>1.3.2.2. System <math>\gamma^+L</math></u>	<u>21</u>
<u>1.3.2.3. Systeme <math>b_0^+,+</math> und <math>B_0^+,+</math></u>	<u>21</u>
<u>1.4. Ziel der Arbeit</u>	<u>24</u>
<u>2. Material und Methoden</u>	<u>26</u>
<u>2.1 Präparation und Kultivierung der Alveolarmakrophagen</u>	<u>26</u>
<u>2.2 Bestimmung der <math>[^3H]</math>-L-Arginin Aufnahme und -metabolisierung</u>	<u>27</u>

<u>2.2.1 Durchführung der Aufnahmeversuche</u>	<u>27</u>
<u>2.2.2 Durchführung der Metabolisierungsversuche</u>	<u>27</u>
<u>2.2.3 HPLC-Analyse</u>	<u>28</u>
<u>2.2.4 Bestimmung der Radioaktivität</u>	<u>29</u>
<u>2.2.5 Nitritbestimmung</u>	<u>30</u>
<u>2.3 Statistische Auswertung</u>	<u>30</u>
<u>2.3.1 Verwendete Computerprogramme</u>	<u>31</u>
<u>2.4. Ansatz der verwendeten Medien und Lösungen</u>	<u>32</u>
<u>2.5 Liste der verwendeten Substanzen und Chemikalien</u>	<u>34</u>
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>36</u>
<u>3.1. Charakterisierung des L-Arginintransports und –stoffwechsels in Alveolarmakrophagen der Ratte</u>	<u>36</u>
<u>3.1.1 Effekte von kationischen Proteinen auf die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen der Ratte</u>	<u>36</u>
<u>3.2 Effekte von Polykationen auf die Stickstoffmonoxidsynthese bei Alveolarmakrophagen durch Nitritbestimmung</u>	<u>40</u>
<u>3.3 Effekte von Polykationen auf den [<sup>3</sup>H]-L-Argininmetabolismus durch iNOS und Arginase in Alveolarmakrophagen</u>	<u>43</u>
<u>4. Diskussion</u>	<u>47</u>
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>55</u>
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>58</u>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA	„Amino acids“, Aminosäuren
AM	Alveolarmakrophagen der Ratte
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
CAA	„Cationic amino acids“, kationische Aminosäuren
cNOS	konstitutive NO-Synthase
DME/F-12	Dulbecco's modifiziertes Eagel's Medium
D-PBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
DPM	Desintegrationen pro Minute, gezählte Zerfälle pro Minute
ecNOS	endotheliale, konstitutive Stickstoffmonoxidsynthase, NOS III
EDRF	„endothelium derived relaxing factor“
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase; NOS II
NAA	Neutrale Aminosäuren
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NANC	„nicht adrenerg – nicht cholinerg“
ncNOS	neuronale, konstitutive NO-Synthasen; NOS I
NEM	N-Ethylmaleimide
NO	„nitric oxide“, Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase

## 1. Einleitung

Die gesamtgesellschaftliche Bedeutung der chronischen Atemwegserkrankungen, insbesondere des Asthma Bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) ist nicht zu unterschätzen. In der heutigen Zeit liegt hier neben der Bedeutung für die Patienten und den Einschränkungen, die sie erfahren müssen, sicher auch ein Augenmerk auf den mit den langfristig notwendigen Therapien verbundenen Kosten, zumal diese Erkrankungen in der Häufigkeit zunehmen (Barnes et al., 1996c).

Stickstoffmonoxid (NO) spielt bei diesen Erkrankungen eine bedeutende Rolle und kann als Marker für deren Aktivität genutzt werden (Kharitonov und Barnes, 1996).

Die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die glatte Muskulatur der Gefäße als EDRF („endothelium derived relaxing factor“) ist lange bekannt und wird auch therapeutisch genutzt (Ignaro et al., 1987). Aber auch der Tonus der glatten Muskulatur der Atemwege wird zumindest partiell über NO reguliert (Belvisi et al., 1992, Nijkamp et al., 1993).

Als Neurotransmitter wird NO von peripheren nicht adrenergen, nicht cholinergen (NANC) Nervenendigungen freigesetzt und vermittelt eine Bronchodilatation. Stickstoffmonoxid fungiert als einer der bekannten Antagonisten zur cholinergen Bronchokonstriktion (Belvisi et al., 1992). Weitere Quellen für NO in den Atemwegen sind das Epithel und glatte Muskelzellen (ten Hacken et al., 1999).

Ausgangspunkt für die NO-Bildung ist L-Arginin. Eine Guanidinogruppe des L-Arginin wird dabei oxidativ mit molekularem Sauerstoff durch Enzyme aus der Familie der NO-Synthasen unter Bildung von NO umgesetzt (Schmidt et al., 1988).

Alternativ kann L-Arginin neben der Beteiligung an der Proteinbiosynthese im Harnstoffzyklus durch Arginase zu L-Ornithin und Harnstoff hydrolysiert werden und dann über Zwischenstufen in die Polyaminsynthese über Putrescin zu Spermidin und Spermin eingehen (Tabor und Tabor, 1984). Diese können dann das Zellwachstum und die Kollagensynthese fördern (Meurs et al., 2003; Schmidt 1994). L-Arginin kann auch durch Arginindeaminasen in L-Citrullin und Ammoniak gespalten werden. Die Aktivität der Arginase wird durch Zytokine gesteigert, die z.B. von Typ2-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Lymphozyten) freigesetzt werden. Durch den verstärkten Umsatz von L-Arginin durch Arginase in nicht hepatischen Zellen kann es zu einem Substratmangel für NOS kommen, da die extrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin abnimmt. Bei Substratmangel steigt die Bildung von Hydroxylradikalen durch die NOS. Die Hydroxylradikale können mit NO zu Peroxynitrit reagieren (Ricciardolo et al., 2004). Dauernde Stimulation der Arginase kann durch Polyaminbildung einen bindegewebigen Umbau der Atemwege zur Folge haben (Meurs et al., 2003).

Von der NO-Synthase sind drei auf verschiedenen Genen kodierte Isoformen bekannt, die sich in ihrem Verteilungsmuster unterscheiden (Schmidt, 1994; Förstermann et al., 1995). Zwei davon, NOS I und NOS III, werden als konstitutive NOS (cNOS) bezeichnet, da sie ständig in der jeweiligen Zelle vorhanden sind. Diese beiden Formen bilden eher kleine Mengen NO (NOS I >0,3 µmol/mg Protein/min; NOS III ca. 0,015 µmol/mg Protein/min). Da die NOS III für die Bildung des EDRF durch das Endothel verantwortlich ist, bezeichnet man sie auch als eNOS, die für die Bildung von NO als Neurotransmitter verantwortliche NOS I als nNOS. Die NOS II, zunächst in Makrophagen nachgewiesen, wird vermehrt nach Stimulation durch exo-

gene proentzündliche Zytokine, z.B. Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (Barnes, 1996; Meurs et al., 2003), aber z.B. auch durch Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien (LPS) exprimiert (Bernareggi et al., 1997; Hey et al., 1995; Wang et al., 1995). Diese Zytokine können dabei z.B. aus aktivierten T<sub>H</sub>2-Lymphozyten und eosinophilen Granulocyten stammen. Diese Wirkung der Zytokine bzw. der Lipopolysaccharide kann durch Glucocortikoide gehemmt werden (Ricciardolo, 2003; Saleh et al., 1998; Morris und Billiar, 1994).

Die NOS II wird deshalb auch als induzierbare NOS (iNOS) bezeichnet. Die iNOS konnte in Makrophagen von Mensch, Pferd, Kuh, Ziege, Schaf, Ratte, Maus und Huhn nachgewiesen werden (MacMicking et al., 1997). Die Induktion durch Lipopolysaccharide konnte für Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen verschiedener Spezies nachgewiesen werden (bei Ratte und Kaninchen z.B. durch Freitag et al., 1996).

Die iNOS unterscheidet sich von den anderen Isoformen durch die von einer erhöhten Calciumkonzentration unabhängige Bindungsstelle für Calmodulin (MacMicking et al., 1997). Calmodulin bindet irreversibel an die iNOS. Außerdem bildet die iNOS erheblich größere Mengen an NO (<1,6  $\mu\text{mol/mg Protein/min}$ ) (Barnes, 1996a; Schmidt, 1994; ten Hacken et al., 1999). Die NOS II - oder iNOS - bildet demnach ungefähr fünfmal mehr NO als die NOS I. Bei Alveolarmakrophagen der Ratte konnte gezeigt werden, dass die iNOS aufgrund des hohen Umsatzes von L-Arginin auf die Aufnahme von außen über bestimmte Transportproteine (CAT2B) angewiesen ist. L-Arginin kann nicht in ausreichendem Maß z.B. aus L-Citrullin gewonnen werden (Hammermann et al., 1998). Bei Substratmangel bildet die iNOS vermehrt Hydroxylradikale, die dann mit NO zu dem pro-

inflammatorisch und cytotoxisch wirksamen Peroxynitrit reagieren können (Ricciardolo et al., 2004).

Die Wirkung von NO in den Atemwegen ist jedoch komplex und war daher Gegenstand vieler Untersuchungen der letzten Jahre (Ricciardolo et al., 2004). Insbesondere die Rolle bei chronischen, entzündlichen Atemwegserkrankungen wurde mehrfach untersucht (z.B. Barnes, 1996, Racké et al., 1996). In geringer Konzentration hat NO eine bronchodilatatorische Wirkung.

Die von der in Makrophagen vorkommenden iNOS gebildeten Mengen an NO haben eine Bedeutung in der Unterhaltung chronisch entzündlicher Prozesse in den Atemwegen (Kharitonov und Barnes, 1996; Maziak et al., 1998). Die Menge an NO steht dabei in Relation zur Aktivität der Entzündung und der Einschränkung der Lungenfunktion (Kariotonov und Barnes, 1996).

Die vasodilatatorische Wirkung von NO kann zu einer zunehmenden Plasmaexsudation und damit zu einer Verlegung der Atemwege führen (Barnes, 1996; Bernareggi et al., 1997; László et al., 1995).

Durch Hemmung der Freisetzung von Interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) aus T<sub>H</sub>1-Lymphozyten kann es zu einer Vermehrung der T<sub>H</sub>2-Lymphozyten mit vermehrter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, z.B. Interleukin 4, kommen (Barnes und Liew 1995). Bei Expression der iNOS kann es aufgrund eines relativen intrazellulären Mangels an L-Arginin zur Bildung von Peroxynitrit aus Hyperoxidationen und NO kommen. Peroxynitrit und Hyperoxidationen entfalten eine gegen Erreger und eigene Zellen gerichtete zytotoxische Aktivität. Dann wirken sie proinflammatorisch (Meurs et al., 2003).

Auf der anderen Seite hemmt NO die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (wie z.B. Leukotrien B<sub>4</sub>) bei Alveolarmakrophagen von Ratten (Brunn et al., 1997).

NO zeigt eine Dualität bezüglich seiner komplexen Wirkungen, wie auch andere wichtige Komponenten der Immunantwort (MacMicking et al., 1997).

Die chronischen, entzündlichen Veränderungen der Atemwege bei Atemwegsüberempfindlichkeit sind durch Einwanderung von u. a. eosinophilen Granulocyten und T-Helferzellen 2 (Th<sub>2</sub>) gekennzeichnet, welche sogar betont häufig vorkommen (Boussquet et al., 1990; Corrigan et Kay ,1992; Kraneveld et al., 1997, Meurs et al., 2003). Eosinophile Granulocyten werden ebenfalls vermehrt im Blut von Patienten mit allergeninduzierter „Spätphase“-Reaktion beobachtet (Durham und Kay, 1995). Die eosinophilen Granulocyten enthalten Granula mit u.a. Major Basic Protein (MBP) und eosinophilic cationic Protein (ECP) und setzen diese bei Aktivierung frei (Gleich et al., 1993; Corrigan und Kay 1992). Bei intratrachealer Applikation dieser kationischen Proteine (MBP und ECP) kann eine Atemwegsüberempfindlichkeit (airway hyperresponsiveness) ausgelöst werden (Gundel et al., 1991; de Boer et al., 1996). Dabei scheint die Ladung der Proteine von Bedeutung zu sein (Coyle et al., 1993a). Diese Effekte können durch die synthetisch herstellbaren und daher besser verfügbaren kationischen Proteine Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin in ähnlicher Weise ausgelöst werden, so dass sich diese für umfangreichere Studien als Testsubstanz anbieten (Uchida et al., 1993). Es wurde beobachtet, dass durch Polykationen ein

Mangel an NO, verursacht durch einen Mangel an Substrat, nämlich L-Arginin, herbeigeführt werden kann (Meurs et al., 1999).

Daher werden diese auch in der vorliegenden Studie als Testsubstanz verwendet.

Die vorliegende Untersuchung soll klären, ob das von eosinophilen Granulozyten freigesetzte MBP einen Einfluss auf die Aufnahme von L-Arginin durch Alveolarmakrophagen der Ratte hat, und wenn ja, ob dies zu einer Änderung des Stoffwechselweges für L-Arginin durch intrazellulären Substratmangel führt. Durch das hieraus gewonnene tiefere Verständnis der Pathophysiologie der chronischen Atemwegserkrankungen lassen sich eventuell neue therapeutische Ansätze ableiten. Dies findet seine Bestätigung darin, dass nach Beendigung dieser Arbeit andere Gruppen nach therapeutischen Möglichkeiten zur Steuerung des Argininmetabolismus in den Atemwegen suchen (Ricciardolo et al., 2005).

### **1.1. Stoffwechselwege des L-Arginin**

L-Arginin wird in der Zelle auf verschiedene Arten verstoffwechselt. Neben der Beteiligung an der Proteinbiosynthese kann L-Arginin durch Arginase im Harnstoffzyklus zu L-Ornithin und Harnstoff hydrolysiert werden, um dann z.B. zu Agmatin decarboxyliert zu werden und über Zwischenstufen in die Polyaminsynthese von Putrescin und weiter Spermin und Spermidin einzugehen (Tabor und Tabor, 1984).

L-Arginin kann auch durch Arginindeaminasen in L-Citrullin und Ammoniak gespalten werden. Oder es kann durch NO-Synthasen oxidativ zu NO und L-Citrullin umgesetzt werden (Schmidt, 1994).

Als Quellen für L-Arginin kommen die Resynthese aus L-Ornithin über den Harnstoffzyklus und möglicherweise über andere Wege aus L-Citrullin und die Aufnahme von außerhalb der Zelle in Betracht (Schmidt, 1994).

Es konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in Ratten Alveolarmakrophagen L-Arginin nicht in für die NO-Synthese ausreichendem Maße aus L-Ornithin oder aus L-Citrullin über den Harnstoffzyklus zur Verfügung steht, so dass für die NO-Synthese die intrazelluläre Verfügbarkeit durch Aufnahme von extrazellulär entscheidend ist (Hammermann et al., 1998; Förstermann und Kleinert, 1995).

## **1.2. Die Stickstoffmonoxidsynthasen**

Von den NO-Synthasen sind bis heute drei Isoformen bekannt. Man unterscheidet die beiden konstitutiven NO-Synthasen Typ I und III (ncNOS und ecNOS) von der durch Zytokine und Endotoxine induzierbaren Form (Typ II, iNOS). Alle drei Formen sind mittlerweile hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation und Aminosäuresequenz charakterisiert (Schmidt et al., 1994; Förstermann et al., 1995). Allen bekannten NO-Synthasen sind die wesentlichen Strukturmerkmale und die zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen, auf die nun näher eingegangen werden soll, gemeinsam.

### **1.2.1. Enzymstruktur und Reaktionsmechanismus**

Bei den NO-Synthasen handelt es sich um Homodimere, calmodulinabhängige oder calmodulintragende Cytochrom-P450 ähnliche Hämoproteine. Zur Synthese von NO benötigen sie neben L-Arginin noch molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) und reduziertes Nicotinamidadenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Cosubstrat. Als essentielle Cofaktoren sind Häm, Flavinadenin-Dinukleotid (FAD), Flavinadeninmononukleotid (FMN), Tetrahydrobi-

opterin ( $\text{BH}_4$ ) und das calciumbindende Regulatorprotein Calmodulin notwendig (Förstermann und Kleinert, 1995). Die iNOS unterscheidet sich von den anderen beiden Isoformen durch die von einer erhöhten Calciumkonzentration unabhängige Bindungsstelle für Calmodulin (MacMicking et al., 1997) – dieses bindet irreversibel an die iNOS – zum anderen durch die erheblich größeren Mengen an NO, die von der iNOS gebildet werden ( $<1,6 \mu\text{mol/mg Protein/min}$ ) (Barnes, 1996a; Schmidt, 1994; ten Hacken et al., 1999). Die NOS II bildet demnach ungefähr fünfmal mehr NO als die NOS I und ungefähr hundertmal mehr als die NOS III. Bei der NO-Synthesereaktion wird in einer ersten Phase L-Arginin durch molekularen Sauerstoff unter Verbrauch von einem NADPH zu  $\text{N}^G$ -Hydroxy-L-Arginin ( $\text{N}^G\text{-OH-L-Arginin}$ ) oxidiert. Unter Verbrauch von einem halben Mol NADPH wird in einer zweiten Phase durch ein weiteres Mol  $\text{O}_2$  die kovalente Bindung zwischen einem terminalen Stickstoffatom und dem Kohlenstoffatom der Guanidino-Gruppe gelöst und es entstehen je ein Mol NO und L-Citrullin (Schmidt, 1994). Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die Isoformen hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften ganz erheblich voneinander. Bei den beiden konstitutiven Formen handelt es sich um sog. „low-output“-Formen. Bei der induzierbaren NO-Synthase handelt es sich um eine „high-output“-Form; die NO-Bildung ist gegenüber den konstitutiven Formen um bis zu 1000-fach höher (Barnes, 1996).

### **1.2.2. Kontrolle der Stickstoffmonoxidbildung**

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) wird im Körper auf zwei Ebenen kontrolliert, und zwar auf der Ebene der Expression der NO-Synthasen und auf der Ebene der Aktivität. Bei den konstitutiven Formen I und III spielt die Kontrolle über die Aktivität eine wichtige Rolle. Die Bindung des essentiell-

len Cofaktors Calmodulin erfolgt nur bei erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration. Diese muss zumindest um die 100 nM betragen (Förstermann et al., 1991). Bei diesen beiden Isoformen erfolgt die Kontrolle der NO-Synthese auf der Ebene der Aktivität.

Bei der Isoform II der NO-Synthasen, der iNOS, erfolgt die NO-Synthese dagegen unabhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration. Sie bindet Calmodulin auch bei geringerer Calciumkonzentration irreversibel (MacMicking et al., 1997). Ist die Transkription einmal erfolgt, dann kann die Aktivität über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben. Eine Kontrolle kann dann noch über das intrazelluläre Angebot an L-Arginin durch Kontrolle der Aufnahme erfolgen (Hammermann et al., 1998; Bogle et al., 1992). Die Induzierbarkeit dieser Isoform durch LPS und Zytokine konnte sowohl für Alveolarmakrophagen der Ratte, als auch für Lungenepithelzellen verschiedener Spezies gezeigt werden und für verschiedene andere Gewebe der Ratte, insbesondere Niere, Herz und Leber (Dorger et al., 1997; Freitag et al., 1996; Jorens et al., 1991; László et al., 1995).

### **1.2.3. Hyperoxidationen- und Peroxynitritbildung durch cNOS und iNOS**

Kommt es zu einer Verminderung des für die ncNOS und für die iNOS verfügbaren L-Arginin, so bilden diese vermehrt Hyperoxidationen. Diese reagieren mit vorhandenem oder gebildetem NO zu Peroxynitrit (Griffith und Stuehr, 1995). Peroxynitrit wiederum hat zytotoxische, proinflammatorische Wirkungen und wirkt konstriktorisch auf die Atemwegsmuskulatur (Meurs et al., 2003). Eine solche Verminderung kann z.B. durch zytokinvermittelte (z.B. aus T-Helferzellen 2) vermehrte Expression der Arginase (Meurs et

al., 2003) oder durch eine Verminderung der Aufnahme entstehen (Hammermann et al., 1999).

### **1.3. Transportmechanismen des iNOS-Substrates L-Arginin**

Nach erfolgter Induktion hängt die Aktivität der iNOS entscheidend von der Verfügbarkeit des extrazellulären L-Arginin ab. Dies gilt auch für Alveolar-makrophagen der Ratte (Jorens et al., 1991; Hammermann et al., 1998).

#### **1.3.1. Charakterisierung der Transportmechanismen für kationische Aminosäuren**

Derzeit sind verschiedene Transportsysteme für kationische Aminosäuren beschrieben. Sie unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche Affinität zu kationischen Aminosäuren, ihrer Abhängigkeit von Natrium und ihrer Fähigkeit auch ungeladene, langkettige Aminosäuren zu transportieren. Im Einzelnen unterscheidet man derzeit  $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $b^{0,+}$  und  $B^{0,+}$  (Closs, 1996; Deves und Boyd, 1998). In den letzten Jahren konnten mehrere cDNA-Klone diesen Transportern auf molekularer Ebene zugewiesen werden. Es wird zwischen den Transportern für kationische Aminosäuren (CATs) und den broad-scope-Transportproteinen unterschieden. Bei Letzteren ist noch ungeklärt, ob es sich dabei tatsächlich um Transporter oder vielmehr um transporterassoziierte regulierende bzw. aktivierende Proteine handelt (Palacin, 1994; Closs, 1996; Devés und Boyd, 1998).

### 1.3.2. Darstellung der verschiedenen Transportsysteme

#### 1.3.2.1. Das $y^+$ -System

Das System  $y^+$  wurde zunächst an Ehrlich-Zellen und Retikulocyten charakterisiert (Christensen und Antonioli, 1969). Es transportiert natriumunabhängig kationische Aminosäuren. Kleine neutrale Aminosäuren werden nur in Gegenwart von Natriumionen mit geringer Affinität transportiert. Das System ist stereoselektiv und sensitiv für Transstimulation, was für Transportproteine charakteristisch ist, die eine erleichterte Diffusion vermitteln (Closs, 1996). Außerdem ist es im Unterschied zu den anderen Transportsystemen durch N-Ethylmaleimide (NEM) hemmbar (Deves et al., 1993). Weitere Untersuchungen zeigten, dass dem hier dargestellten  $y^+$  auf molekularer Ebene die kationischen Aminosäure-Transporter (CAT's) entsprechen. Aus dieser Enzymfamilie sind mindestens fünf Vertreter bekannt: CAT-1, CAT-2A, CAT-2B, CAT-3 und CAT-4 (Closs, 1996; Hosokawa et al., 1997). Die Unterschiede zwischen diesen Proteinen liegen in ihrer Substratspezifität und ihrer Transportaktivität (Closs, 1996; Devés und Boyd, 1998). Nachfolgend wird nur auf die im Rahmen dieser Arbeit beteiligten Transportproteine, CAT-1 und CAT-2, eingegangen.

#### CAT-1

Ursprünglich als Membranrezeptor für das ectrophanische murine Leukämievirus identifiziert (Albritton et al., 1989), charakterisierten nachfolgende Untersuchungen mittels Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und Aufnahmeversuche mit verschiedenen Aminosäuren ihn als Transporter für kationische Aminosäuren (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991) und führten zu der heutigen Bezeichnung mCAT-1 (Closs et al., 1993a). Mittlerweile wurde

neben den Transportern der Maus auch die cDNA's für den Menschen (Albritton et al., 1992; Yoshimoto et al., 1991) und die Ratte identifiziert (Puppi und Henning, 1995; Wu et al., 1994).

Der Transport von kationischen Aminosäuren wird durch den CAT-1 selektiv und natriumunabhängig sowohl in die Zelle hinein als auch heraus vermittelt. Der Transport ist stereoselektiv, transsensitiv und in Abhängigkeit von der Substratkonzentration sättigbar (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991). Damit verkörpert der CAT-1 alle Eigenschaften des System  $\gamma^+$ . Da er in fast allen Organsystemen – mit Ausnahme der Leber – exprimiert wird, gilt er als Haupttransportprotein für kationische Aminosäuren.

## **CAT-2**

Von diesem Transporter existieren zwei Splice-Varianten. Diese unterscheiden sich bei der Maus lediglich hinsichtlich 20 Aminosäuren auf einer Länge von 42 Aminosäuren (Closs et al., 1993 a,b), zu 97% sind sie identisch. Sie unterscheiden sich beim Menschen in der Translation eines von zwölf Exons (7 bei hCAT-2A bzw. 6 bei hCAT2B) (Hammermann et al., 2001). Hierdurch unterscheiden die beiden Transporter sich erheblich in ihrer Substratspezifität (Simmons et al., 1996). Die als mCAT-2A bezeichnete Isoform wurde zuerst in der Leber nachgewiesen (Closs et al., 1993b, Kavanaugh et al., 1994). Aus einer T-Zell-Lymphomlinie (Closs et al., 1993b; Kavanaugh et al., 1994; MacLeod et al., 1990) wurde später die zweite Form, mCAT-2B, isoliert. Die entsprechenden cDNA-Klone konnten auch beim Menschen identifiziert werden (Closs et al., 1997). Auch der mCAT-2B transportiert kationische Aminosäuren natriumunabhängig, stereoselektiv, transselektiv und ist sättigbar, ähnlich dem mCAT-1, und erfüllt die typischen Eigenschaften des  $\gamma^+$ -Systems (Kakuda et al., 1993; Closs et al.,

1993b). Der CAT-2B hat eine hohe Affinität zu L-Arginin (Simmons et al., 1996). Im Unterschied dazu zeigt der mCAT-2A eine deutlich reduzierte Substrataffinität und eine fehlende Sensitivität für Transstimulation. Er wird daher auch als „low-affinity“-Transporter bezeichnet. Gemeinsam mit dem  $\gamma^+$ -System ist ihm der natriumunabhängige, stereoselektive und sättigbare Transport kationischer Aminosäuren (Closs et al., 1993 a,b; Kavanaugh et al., 1994).

Für diese Untersuchung ist hauptsächlich der CAT-2B interessant. Er wurde in aktivierten Makrophagen nachgewiesen (Simmons et al., 1996; Racké et al., 1998). Der CAT-2A wurde nur in Leberzellen nachgewiesen. Der CAT-1 kommt ubiquitär vor. Es konnte durch diese Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durch LPS die Transkription des CAT-2B-Gen zunimmt, nicht jedoch das des CAT-1 (Messleri-Dreissig et al., 2000). Daher kann man annehmen, dass der Transport des für die NO-Synthese wichtigen L-Arginin durch die iNOS hauptsächlich durch den CAT-2B erfolgt. Die Vermutung liegt nah, dass eine Änderung des L-Arginin Transport die NO-Synthese beeinflusst (Simmons et al., 1996).

### 1.3.2.2. System $y^+L$

Dieser Transportmechanismus verfügt über  $y^+$ -ähnliche ( $y^+L = y^+like$ ) Eigenschaften. Er transportiert bei deutlich geringerer Affinität mit hoher Kapazität natriumunabhängig kationische Aminosäuren. Er besitzt zusätzlich eine hohe Affinität zu großen, neutralen Aminosäuren wie L-Leucin. Diese werden mit geringer Kapazität natriumabhängig transportiert. Der  $y^+L$  kann im Gegensatz zu  $y^+$  nicht durch NEM inhibiert werden (Devés et al., 1993). Zuerst wurde  $y^+L$  in humanen Erythrocyten beschrieben (Devés et al., 1992). Diesem Transportsystem wird auf molekularer Ebene das Protein 4F2hc (heavy chain) zugewiesen. Durch Infektion mit mRAN des humanen Protein 4F2hc war es gelungen, in Oocyten von *Xenopus laevis* Merkmale des Transportsystems  $y^+L$  zu induzieren (Fei et al., 1995). Mittlerweile konnten auch für die Ratte, die Maus und den Menschen entsprechende cDNA-Klone identifiziert werden (Bröer et al., 1995; Lamadue et al., 1987; Parmacek et al., 1989; Quackenbusch et al., 1987; Teixeira et al., 1987; Yao et al., 1998).

### 1.3.2.3. Systeme $b^{0,+}$ und $B^{0,+}$

Diese beiden Systeme transportieren mit hoher Affinität kationische Aminosäuren (Van Winkle et al., 1985; 1988). Der Transport durch  $B^{0,+}$  erfolgt natriumabhängig. Anders beim System  $b^{0,+}$ , bei welchem der Transport durch Natrium inhibiert werden kann. Beide Systeme können auch große neutrale Aminosäuren transportieren. Der Transport erfolgt durch das System  $b^{0,+}$  natriumunabhängig, anders als durch  $B^{0,+}$  (Closs, 1996; Devés und Boyd 1998). Noch fehlt ein molekulares Korrelat für das System  $B^{0,+}$ . Die Eigenschaften von  $b^{0,+}$  konnten im Gegensatz dazu durch Injektion von mRNA

des Protein rBAT („related to b<sup>0+</sup>-amino acid transporter“) aus der Niere von Kaninchen (Bertran et al., 1992) und des Proteins D2 aus der Niere von Ratten in Oocyten von *Xenopus laevis* in diesen induziert werden. (Wells und Hediger, 1992). Eine rBAT-cDNA für den Menschen konnte ebenfalls aus der Niere isoliert werden (Bertran et al., 1993).

### Transportsysteme

	<b>Y<sup>+</sup></b>	<b>y<sup>+</sup>L</b>	<b>b<sup>0,+</sup></b>	<b>B<sup>0,+</sup></b>
<b>Spezifität</b>	CAA	CAA,NAA	CAA,NAA	CAA,NAA
<b>Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit</b>	Nein	Für CAA nein, für NAA ja	Nein	Ja
<b>Entsprechende cDNA</b>	CAT-1/CAT-2	4F2hc	rBAT/D2	-
<b>Aminosäuren</b>	624/657 (Ratte)	527 (Ratte)	683 (Ratte)	-
<b>Vorkommen</b>	CAT-1: ubiquitär CAT-2A: Leberzellen. CAT-2B: aktive Lymphocyten, Makrophagen	Lymphocyten, Plazenta, Niere	Niere, Darm	-

**Tab.1: Transporter für kationische Aminosäuren** (modifiziert nach Devés et al., 1998)  
(Abkürzungen: AA: Aminosäuren (amino acids); CAA: kationische Aminosäuren (cationic amino acids); NAA: neutrale Aminosäuren (neutral amino acids))

#### **1.4. Ziel der Arbeit**

Dem NO wird eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und dem Unterhalt entzündlicher Atemwegserkrankungen zugeschrieben (Barnes, 1996b). In der vorliegenden Untersuchung soll der Effekt kationischer Proteine auf die L-Argininaufnahme - das notwendige Substrat zur Bildung von NO - in Alveolarmakrophagen der Ratte untersucht werden. Weiteres Ziel ist die Charakterisierung der Eigenschaften des Transportsystems (insbesondere des CAT-2B) sowie der Einfluss einer Änderung der L-Argininaufnahme auf die NO-Synthese und auch die Beschreibung des L-Argininstoffwechsels als weitere Wirkung der kationischen Proteine. Alveolarmakrophagen können nach Stimulation mit LPS durch Induktion der iNOS in großen Mengen NO bilden. Ein Maß für die Aktivität der iNOS ist die Menge des anfallenden L-Citrullin als ein Nebenprodukt der NO-Synthese, insbesondere in Relation zur Menge an L-Ornithin, u. a. dem Produkt der Arginase. Aus dem Verhältnis beider Substanzen kann auf die Aktivität der NO-Synthase rückgeschlossen werden. Ergänzend wird die Menge des gebildeten NO über Nachweis des entstandenen Nitrit gemessen. So lassen sich die Messungen bezüglich der NO-Bildung mit einer zweiten Methode überprüfen. Aus den Ergebnissen lassen sich möglicherweise Rückschlüsse auf die Wirkung des MBP und damit auch der eosinophilen Granulocyten bei chronischen, entzündlichen Atemwegserkrankungen ziehen. Da die biologischen Effekte von MBP durch synthetische, kationische Peptide, insbesondere durch Poly-L-Arginin und durch Poly-L-Lysin, in ähnlicher Weise beobachtet werden können (Coyle et al., 1993; Uchida et al., 1993) und die Verfügbarkeit MBP sehr begrenzt ist, wurden die meisten Experimente mit diesen synthe-

tischen und daher besser verfügbaren, kationischen Proteinen durchgeführt. Möglicherweise lassen sich Rückschlüsse auf die Rolle der Alveolar-makrophagen, ihrer Transportmechanismen für kationische Aminosäuren und des von ihnen gebildeten NO bei chronischen Atemwegserkrankungen mit Atemwegsüberreaktibilität ziehen. Auch die Rolle der kationischen Polypeptide und der eosinophilen Granulocyten wird eventuell klarer. Vielleicht lassen sich aus den gewonnenen Erkenntnissen sogar neue therapeutische Ansätze herleiten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Präparation und Kultivierung der Alveolarmakrophagen

Sprague Dawley Ratten (eigene Zucht, Universität Bonn) beiderlei Geschlechts wurden durch Genickschlag betäubt und ausgeblutet. Die Lungen und die Trachea wurden am Stück herauspräpariert, anschließend mit calcium- und magnesiumfreier Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (D-PBS) gewaschen, dann dreimal mit ca. 15 ml kalter (4° C) D-PBS laviert. Für einen Ansatz mit Alveolarmakrophagen (AM) wurden meist die Lavageflüssigkeiten von 4-5 Präparaten gesammelt, vereint, und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden dreimal mit D-PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen in variiertem DME/F-12 Medium (siehe Anhang), suspendiert. Mit einer Zählkammer (Neubauer Zählkammer) wurde die Zellzahl bestimmt und durch Trypanausschlussfärbung die Vitalität überprüft (immer größer 95 %). Die Alveolarmakrophagen wurden auf sterile 6-Schalen-Platten (rechnerisch  $2,5 \times 10^6$  Zellen/Schale bei Metabolisierungsversuchen,  $3 \times 10^6$  Zellen/Schale bei Aufnahmeversuchen, Kulturoberfläche  $9,6 \text{ cm}^2$ /Schale) oder auf sterile 24-Schalen-Platten ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/Schale bei Aufnahmeversuchen mit MBP und Versuchen zur Nitritbestimmung; Kulturoberfläche  $1,9 \text{ cm}^2$ /Schale) ausgesät (Platten von NUNC, Wiesbaden). Es wurde auf 1 ml Medium (bei Versuchen mit MBP oder zur Nitritbestimmung auf 0,5 ml) aufgefüllt. Die Alveolarmakrophagen wurden für 2 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um ein Festsetzen an den Schalen zu ermöglichen. Nach 2 Stunden wurde das Medium steril abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Die anhaftenden Zellen bestanden nach morphologischen Kriterien zu mehr als 95 % aus Alveolarmakrophagen. Danach wurden die Zellen für 20 Stunden in Abwesenheit

oder Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Hieran schloss sich die jeweilige, versuchsspezifische Inkubation an.

## **2.2 Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-L-Arginin Aufnahme und -metabolisierung**

### **2.2.1 Durchführung der Aufnahmeversuche**

In [<sup>3</sup>H]-L-Arginin Aufnahmeversuchen wurden Alveolarmakrophagen nach 22 Stunden Kulturphase für 2 Minuten bei 37° C in 1ml Krebs-HEPES Lösung (siehe auch 2.4), die 100 nM L-Arginin inklusive 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-L-Arginin enthielt, inkubiert. MBP Aufnahmeversuche wurden in 300 µl durchgeführt. Die Inkubation geschah in der Abwesenheit oder Anwesenheit von Polykationen. Nach 2 Minuten wurde die mit [<sup>3</sup>H]-L-Arginin markierte Krebs-HEPES Lösung entfernt und dreimal mit nicht markierter, eiskalter Krebs-HEPES Lösung (enthielt 10 mM L-Arginin) gewaschen. Es wurde eine Dauer von zwei Minuten gewählt, da zuvor durch diese Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme im Intervall von 1-3 Minuten linear verläuft (Hey et al., 1997). Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml 0,1-prozentigem Tris/Triton lysiert. Hierdurch wurde das intrazellulär angereicherte [<sup>3</sup>H]-L-Arginin freigesetzt. Nach 20 Minuten bei 37°C wurde das Lysat von den Platten in 1 ml Eppendorfgefäße abgenommen und für 2 Minuten bei 16.000 x g in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden in 5 ml Zählgefäße („Counting-Vials“ aus Polyethylen) pipettiert. Bei MBP-Aufnahmeversuchen wurde mit 500 µl lysiert und 250 µl zur Radioaktivitätsbestimmung benutzt.

### **2.2.2 Durchführung der Metabolisierungsversuche**

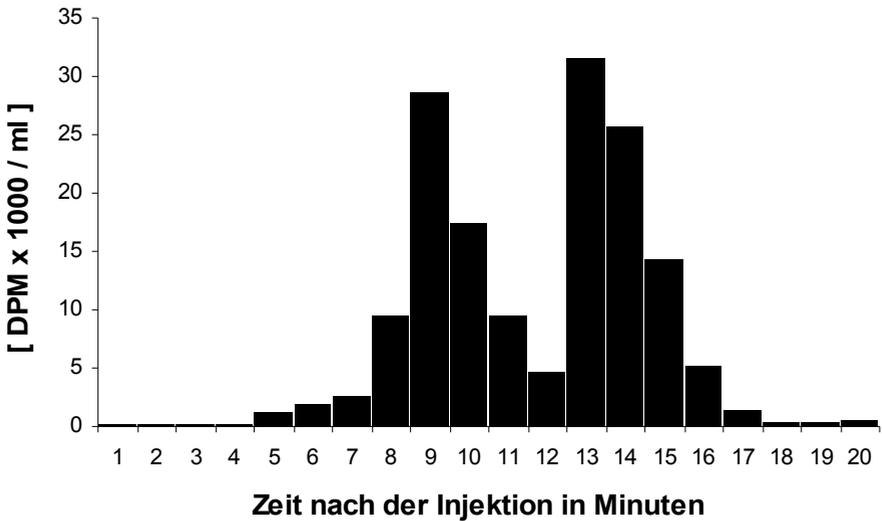
Alveolarmakrophagen wurden nach 20 Stunden Kultur in Anwesenheit oder Abwesenheit von 1 µg/ml LPS für 1 Stunde in 1 ml Krebs-HEPES Lösung die 100 nM L-Arginin inklusive 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]-L-Arginin enthielt, in Abwesenheit oder Anwesenheit von Polykationen inkubiert. Nach 1 Stunde bei 37° C wurde das Inkubationsmedium abgenommen und in 1 ml Eppendorfgefäßen bei -20° C bis zur HPLC-Analyse gelagert.

### **2.2.3 HPLC-Analyse**

Die HPLC bestand aus einer „reversed-phase“ Kieselgelsäule (Länge 250 mm; Innendurchmesser 4,6 mm, gepackt mit Shadon ODS-Hypersil, 5 µm) und als mobile Phase einem Natriumphosphatpuffer (0,1 M; pH 1,8), der Oktansulfonsäurenatriumsalz (400mg/l), Na<sub>2</sub>EDTA (0,3 mM) und Methanol (6% vol/vol) enthielt. Die HPLC-Pumpe (M600/200 Gynkotek, München) wurde für 30 Minuten auf eine Durchflussrate von 1 ml/min eingestellt. Mit einer Einwegspritze (2 ml) wurde das aufgetaute Inkubationsmedium (aus 2.2.2) durch einen 0,2 µm Membranfilter (Minisart RC 4, Sartorius, Göttingen) filtriert, anschließend wurden 200 µl des Filtrats mit einer Hamilton-Spritze (Fischer, Frankfurt) in die HPLC-Anlage injiziert. Das Eluat der ersten 20 Minuten wurde mit einem Fraktionssammler (Retriever II Waters, Millipore, Frankfurt) in Fraktionen von 1 Minute in Zählgefäßen („Counting-Vials“ aus Polyethylen, 5 ml) gesammelt. Die nachfolgenden 90 Minuten wurde die Durchflussrate auf 1,5 ml/min eingestellt. In diesen Bereich - bei ca. 45 Minuten - fiel die Auswaschung des L-Arginin. Anschließend wurde die [<sup>3</sup>H]-Aktivität der 1-ml-Aliquote bestimmt. 100 µl der jeweiligen Probe bzw. des Standards dienten zur Bestimmung der Gesamtaktivität. Die Iden-

tifizierung der Metaboliten L-Ornithin und L-Citrullin erfolgte mit [ $^{14}\text{C}$ ] markiertem L-Ornithin und L-Citrullin als externer Standard für die jeweiligen Retentionszeiten.

### Chromatogramm



**Abb. 1: Beispiel Chromatogramm.** Dargestellt sind die nach Abgleich mit dem internen Standard gemessenen Desintegrationen pro Minute pro ml (DPM/ml). Deutlich sind die beiden Spitzen („Peaks“) bei 9 Minuten für L-Citrullin und bei 13 Minuten für L-Ornithin. Die Retentionszeiten wurden mit [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertem L-Citrullin, bzw. L-Ornithin bestimmt.

### 2.2.4 Bestimmung der Radioaktivität

In die Zählgefäße (s. o.) wurden 3 ml handelsüblicher Szintilisationscocktail (Lumasafe, Zinser, Frankfurt) gegeben. Gemessen wurde die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintilationsspektrometrie in einem Flüssigkeitsszintilationsspektrometer (Beckman LS 5000TD). Die Zähleffizienz wurde über externe Standards korrigiert und in „desintegrates per minute“ (DPM, Zerfälle pro Minute) ausgedrückt. Die Ergebnisse wurden als DPM oder in Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben.

### 2.2.5 Nitritbestimmung

Zur Bestimmung des Nitritgehaltes wurden Alveolarmakrophagen,  $0,5 \times 10^6$  Zellen, in An- oder Abwesenheit von  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 20 Stunden kultiviert, gewaschen und bei  $37^\circ \text{C}$  für 6 Stunden in  $0,5 \text{ ml}$  Krebs-HEPES-Lösung mit oder ohne L-Arginin ( $0,1 \text{ mM}$ ) und zusätzlich Poly-L-Arginin oder Poly-L-Lysin inkubiert. Die Inkubationsmedien wurden gesammelt und bei  $-80^\circ \text{C}$  aufbewahrt, bis die Nitritmenge bestimmt wurde.

Das aus Sauerstoff aus der Luft und  $\text{NO}$  spontan entstehende Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) wurde in zellfreien Überständen der 6 h Inkubationsperiode (s. o.) durch eine spektralphotometrische Methode, basierend auf der Griess-Reaktion bestimmt.  $400 \mu\text{l}$  Griess-Reagenz (Sulfanilsäure 1 %, N(1-Naphthyl)-Ethyldiaminehydrochlorid 0,1 %, gelöst in 2,5 % (G/V) Phosphorsäure) wurden zu  $400 \mu\text{l}$  Inkubationsmedium gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei  $540 \text{ nm}$  gemessen. Die angegebenen Nitritgehalte, unter Ergebnisse (Abschnitt 3.3) angegeben, wurden aus einer Standardkurve ermittelt ( $\text{NaNO}_2$ ) und als  $\text{nmol Nitrit pro } 10^6 \text{ Zellen/6h}$  dargestellt.

## **2.3 Statistische Auswertung**

Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM einer Anzahl von  $n$  Experimenten. Die Überprüfung auf Signifikanz der Ergebnisse geschah mit dem *t-Test*. Beim Vergleich mehrerer Gruppen miteinander erfolgte die Überprüfung auf statistische Signifikanz mittels ANOV-Analyse, gefolgt von einem nach Bonferroni modifizierten *t-Test* unter Benutzung des Computerprogrammes GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, USA). Statistische Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurden als signifikant bezeichnet.

### **2.3.1 Verwendete Computerprogramme**

*Word 2002 (Microsoft):*

Die Texte wurden mit diesem Programm erstellt.

*Excel 2000 (Microsoft)*

Die Versuchsergebnisse wurden mit diesem Programm erfasst und kalkuliert. Die ermittelten Werte wurden in einzelnen Datenblättern sowie Mittelwerttabellen festgehalten und bildeten die Grundlage für die weitere graphische und statistische Auswertung der Daten.

*GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software):*

Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte mit diesem Programm.

*GraphPad InStat (GraphPad Software):*

Mit diesem Programm erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse wie oben beschrieben.

## 2.4. Ansatz der verwendeten Medien und Lösungen

### Ansatz des Mediums für die Kultur der Alveolarmakrophagen DME/Ham's F-12 (2.1)

a) Ansatz des Basismediums

DME/F12-HAM-Pulvermedium

+NaHCO<sub>3</sub>

mit NaOH auf pH 7,2 einstellen

b) Ansatz des Kulturmediums

Basismedium

+FKS	5%
+Penicillin	100 U/ml
+ Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin B	5 µg/ml

### Lösungen für die [<sup>3</sup>H]-L-Arginin-Aufnahme und Metabolisierung (2.2.1;2.2.2)

a) Ansatz von 10x Krebsstamm	<u>Endkonzentration</u>
NaCl	1,174 M
KCl	63 mM
CaCl <sub>2</sub> -Stamm	10 mM
MgCl <sub>2</sub> -Stamm	6 mM

## b) Ansatz für Krebs-HEPES-Lösung

10x Krebsstamm	1x
HEPES-Puffer, pH 7,4	20 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	30 µM
Ascorbisäurelösung, 1%	0,001% (w/v)
D-(+)-Glucose-Monohydrat	11,1 mM

## c) Ansatz der Waschlösung

Krebs-HEPES-Lösung	
1 M L-Arginin-Lösung	10 mM

## d) Ansatz der Lösung für Aufnahme und Metabolisierung

Krebs-HEPES-Lösung	
10µM L-Arginin-Lösung	100 nM
[ <sup>3</sup> H]-L-Arginin	1 µCi/ml

Ansatz des Griess-Reagenz (2.2.5)

Sulfanilamid	1%(w/v)
N-(1-Naphtyl)-ethylendiaminhydrochlorid	0,1%(w/v)
Phosphorsäure	2,5%(w/v)

Ansatz für die mobile Phase der HPLC

Natrium-Phosphat-Puffer (pH 1,8)	0,1 M
Oktansulfonsäure-Natriumsalz	400 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	0,3 mM
Methanol	(6% vol/vol)

## 2.5 Liste der verwendeten Substanzen und Chemikalien

	<b>Firma</b>
Amphotericin B	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucosemonohydrat	Dextro Med
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich
Nutrient Mixture F-12 HAM (DME/F12 HAM Medium)	
Dulbecco's Phosphat buffered saline (D-PBS)	Sigma-Aldrich
Ethanol (absolut)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FKS)	Vitromex
Kaliumchlorid	Merck
L-(+)-Ascorbinsäure	Merck
L-Argininhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharide (LPS) von <i>Eschericia coli</i> 0127:B8	Sigma-Aldrich
L-Leucin	Sigma-Aldrich
L-Lysinhydrochlorid	Sigma-Aldrich
N-(1-Naphtyl)-ethylendiaminhydrochlorid	Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Merck
Poly-L-Arginin (MW: 5.000-15.000)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin (MW: 4.000-15.000)	Sigma-Aldrich
Protamin	Sigma-Aldrich
Radiochemikalie: L-[2,3- <sup>3</sup> H]-Arginin	NEN DuPont
Szintillationscocktail	Luma Safe
Tris Hydrochlorid	Life Technologies

**Major Basic Protein (MBP):** MBP wurde freundlicherweise von Prof. Gert Folkerts (Utrecht) und seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Es wurde aus den eosinophilen Granulocyten von Patienten mit nachgewiesener Eosinophilie gewonnen (siehe auch Slifman et al., 1986). Die Granula wurden mit 0,01 M HCl, pH 2 und Beschallung lysiert. Die Extrakte aus den Granula wurden mittels HPLC über eine 1,2 x 47 cm Sephadex G50 Säule,

equilibriert mit 0,025 M Natrium-Acetat und 0,15 M NaCl, pH 4,3 aufgetrennt. Die Fraktionen vom dritten Peak wurden als MBP gesammelt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert und unmittelbar vor Gebrauch entnommen. Das MBP war rein, gemäß den Banden nach Elektrophorese durch Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel, nach Färbung mit Coomassie brilliant Blau.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung des L-Arginintransports und –stoffwechsels in Alveolarmakrophagen der Ratte

Im Mittelpunkt der im Folgenden dargestellten Untersuchung stand der Einfluss von kationischen Proteinen, insbesondere Poly-L-Arginin, Poly-L-Lysin, Major Basic Protein und Protamin auf die L-Arginin Aufnahme über den CAT-2B Transporter und den weiteren Metabolismus von L-Arginin zu L-Citrullin und NO bzw. zu Ornithin in Alveolarmakrophagen der Ratte.

##### 3.1.1 Effekte von kationischen Proteinen auf die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen der Ratte

Alveolarmakrophagen wurden nach 20 Stunden Kultur, mit oder ohne LPS (1 µg/ml), in Anwesenheit kationischer Proteine für 2 Minuten inkubiert. Im Inkubationsmedium befand sich als radioaktiver Marker [<sup>3</sup>H]-L-Arginin (37 kBq/ml, 0,1 µM).

Bei Alveolarmakrophagen, die für 2 Minuten unter Kontrollbedingungen mit [<sup>3</sup>H]-L-Arginin (37 kBq/ml, 0,1 µM) inkubiert wurden, konnten  $20.238 \pm 2.821$  DPM/( $3 \times 10^6$  Zellen) als aufgenommene Aktivität gemessen werden. Dies entspricht  $1,3 \pm 0,16$  pmol L-Arginin/( $3 \times 10^6$  Zellen) (n=15). Die verschiedenen kationischen Proteine Poly-L-Arginin, Poly-L-Lysin, Protamin und MBP beeinflussten die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme konzentrationsabhängig (siehe auch Abb. 2 und Tabelle 2). Poly-L-Arginin hemmte die Aufnahme stärker als die anderen getesteten kationischen Proteine um etwa 80 % in der höchsten getesteten Konzentration (300 µg/ml). Bei einer Konzentration von 300 µg/ml hemmten Poly-L-Lysin und Protamin die [<sup>3</sup>H]-

L-Argininaufnahme um 40 – 50 % und MBP um ca. 35 % bezogen auf die jeweiligen Kontrollen.

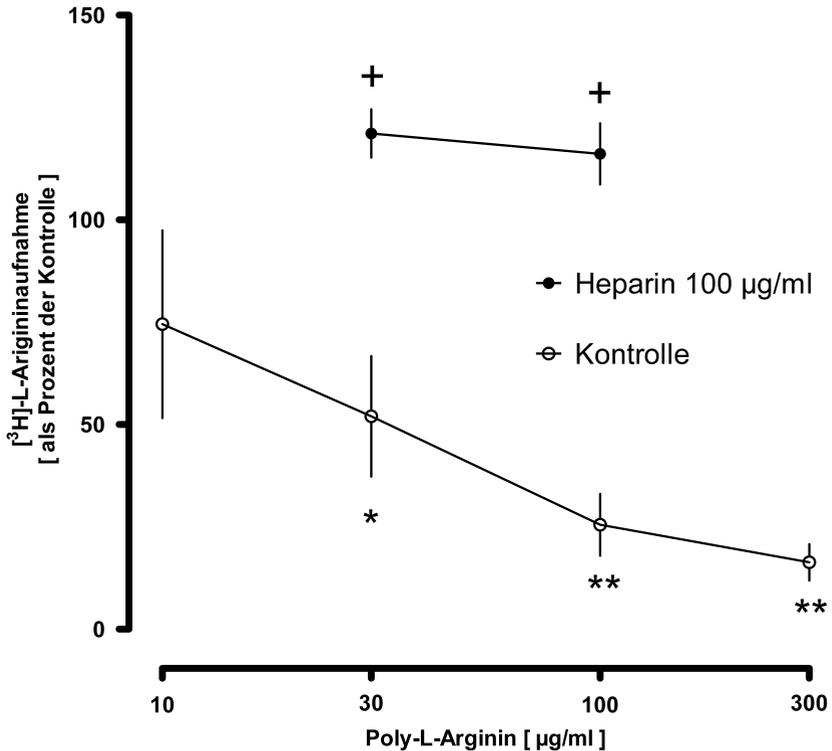
Heparin (100 µg/ml) im Inkubationsmedium, zusammen mit den kationischen Proteinen, verhinderte den hemmenden Einfluss von Poly-L-Arginin (siehe Abb. 2) und Poly-L-Lysin (jeweils 30 µg/ml und 100 µg/ml getestet, jeweils n=6) auf die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme. Heparin (100 µg/ml) alleine hatte keinen Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen (n=6, Daten nicht dargestellt).

Poly-L-Aspartat als Beispielsubstanz für ein anionisches Protein beeinflusste die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen nicht (n=6, Daten nicht aufgeführt).

War während der Kulturphase von 20 Stunden LPS (1 µg/ml) anwesend, stieg die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme unter Kontrollbedingungen auf  $70.031 \pm 10.807$  DPM/( $3 \times 10^6$  Zellen) (n=6). Poly-L-Arginin (100 und 300 µg/ml) reduzierte die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme auf  $38 \pm 4$  %, bzw.  $21 \pm 3$  % (jeweils n=6) der jeweiligen Kontrolle. Der Effekt auf die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme von Poly-L-Arginin ist nach Kultur in Anwesenheit von LPS (1 µg/ml) vergleichbar mit dem Effekt auf Alveolarmakrophagen nach Kultur ohne LPS. Poly-L-Lysin (100 µg/ml und 300 µg/ml) verminderte die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Kultur in Anwesenheit von LPS lediglich auf  $91 \pm 10$  % und  $74 \pm 5$  % (jeweils n=6). Im Gegensatz zu Poly-L-Arginin war der hemmende Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]-L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen der Ratte nach Kultur in Anwesenheit von LPS (1 µg/ml) durch Poly-L-Lysin deutlich reduziert, verglichen mit dem Effekt auf Alveolarmakrophagen, die in Abwesenheit von LPS kultiviert wurden.

	Konzentration [ µg/ml ]			
	10	30	100	300
Poly-L-Arginin	74 ± 22	52 ± 14*	35 ± 9†	16 ± 4†
Poly-L-Lysin	122 ± 9	106 ± 8	62 ± 5*	58 ± 3†
Protamin	102 ± 5	91 ± 4	78 ± 5*	51 ± 4†
MBP	n. d.	90 ± 3	77 ± 2*	65 ± 6*

**Tab. 2 Alveolarmakrophagen der Ratte** ( $3 \times 10^6$  Zellen/Schale), nach 20 Stunden Kultur, wurden für 2 Minuten in aminosäurefreier Krebs-HEPES-Lösung, in der [ $^3\text{H}$ ]-L-Arginin (37 kBq, 0,1 µM) und die kationischen Proteine in der angegebenen Konzentration enthalten waren, inkubiert. Die zelluläre Radioaktivität wurde als Maß für die L-Argininaufnahme gewertet. Angegeben ist die Aktivität in Prozent, bezogen auf den Mittelwert, der in der Kontrolle der jeweiligen Zellpopulation gemessen wurde (die absoluten Zahlen in DPM sind z. T. (s. o.) im Ergebnisteil aufgeführt, angegeben ist der Mittelwert ± SEM von 6 bis 9 Experimenten. Signifikanz der Differenz: \* p < 0,05, † p < 0,01 bezogen auf die jeweilige Kontrolle, n. d.: nicht gemessen.



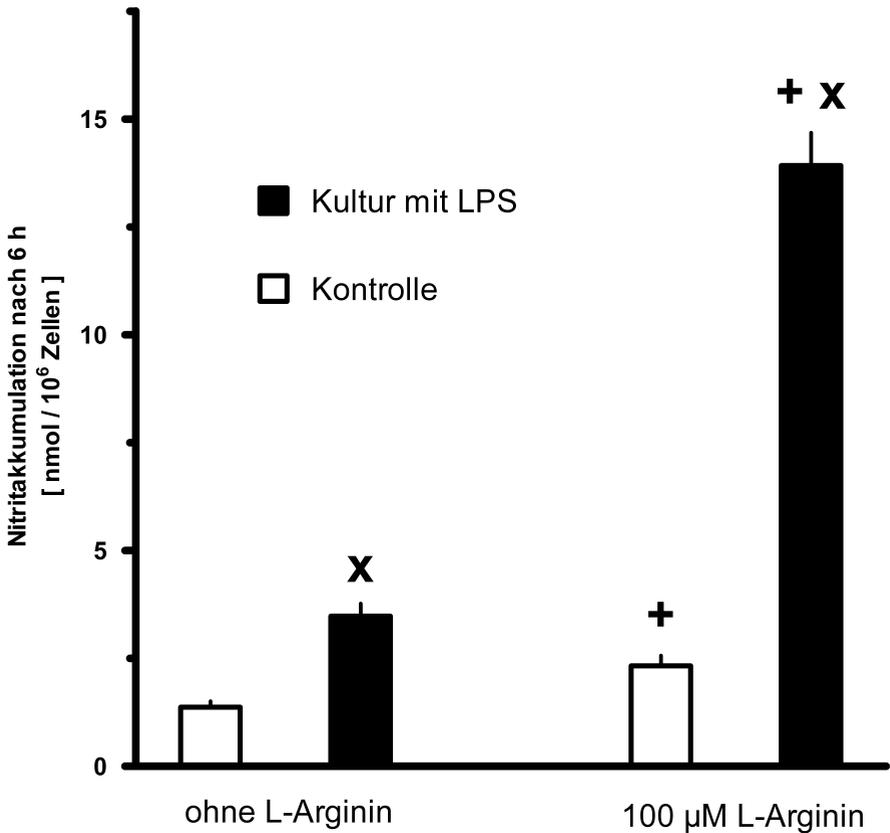
**Abb. 2: Effekt von Poly-L-Arginin auf die  $[^3\text{H}]$ -L-Argininaufnahme in Alveolarmakrophagen der Ratte.** Alveolarmakrophagen wurden nach 20 Stunden Kultur ( $3 \times 10^6$  Zellen/Schale) für 2 Minuten in aminosäurefreier Krebs-HEPES-Lösung, die  $[^3\text{H}]$ -L-Arginin (37 kBq, 0,1  $\mu\text{M}$ ) und Poly-L-Arginin allein, in der unter der x-Achse angegebenen Konzentration, oder in Kombination mit Heparin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthält, inkubiert. Auf der Ordinate ist die zelluläre Radioaktivität in Prozent des Mittelwertes der jeweiligen Kontrolle der jeweiligen Zellpräparation als Mittelwert  $\pm$  SEM von 6 bis 9 Experimenten, abgetragen. Signifikanz der Unterschiede: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, +  $p < 0,01$  bezogen auf den jeweiligen Wert ohne Heparin.

### **3.2 Effekte von Polykationen auf die Stickstoffmonoxidsynthese bei Alveolarmakrophagen durch Nitritbestimmung**

Zusätzlich wurde der Effekt von Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin auf die entstehende Menge Nitrit als Maß für die NO-Synthese in Alveolarmakrophagen untersucht. Der Überstand des Inkubationsmediums wurde nach erfolgter Inkubation zur Bestimmung der Nitritakkumulation abgenommen. Das aus Stickstoffmonoxid (NO) - dem Produkt der iNOS – mit Sauerstoff aus der Luft entstehende Nitrit bzw. Nitrat wurde, wie oben beschrieben, bestimmt.

Wurden Alveolarmakrophagen nach 20 Stunden Kultur in Abwesenheit von LPS für 6 Stunden in aminosäurefreier Krebs-HEPES-Lösung inkubiert, entstand nur eine geringe Menge Nitrit ( $1,37 \pm 0,14$  nmol) im Medium und eine Zufuhr von  $100 \mu\text{M}$  L-Arginin verursachte einen Anstieg um 70%. Bei durch LPS stimulierten Alveolarmakrophagen lag die Nitritmenge in L-Arginin freier Inkubationslösung bei  $3,48 \pm 0,29$  nmol. Mit  $100 \mu\text{M}$  L-Arginin lag sie ca. um den Faktor 4 höher (siehe Abb. 3). Poly-L-Arginin ( $100 \mu\text{M}$  und  $300 \mu\text{M}$ ) senkte die Nitritmenge in L-Arginin freiem Medium sowohl bei Alveolarmakrophagen, die nicht während der Kultur durch LPS stimuliert wurden waren, als auch bei durch LPS im Kulturmedium ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimulierten Alveolarmakrophagen um 10-50%. Im Medium mit L-Arginin ( $100 \mu\text{M}$ ) wurde die Nitritmenge stärker gesenkt, um 60 % bei Kontrollalveolarmakrophagen, um 85 % bei durch LPS stimulierten Alveolarmakrophagen. Poly-L-Lysin hatte bei Inkubation ohne L-Arginin in der Inkubationslösung keinen eindeutigen Effekt, weder bei Kontrollalveolarmakrophagen noch bei durch LPS stimulierten Alveolarmakrophagen. Bei Anwesenheit von L-Arginin ( $100 \mu\text{M}$ ) in der Inkubationslösung war eine signifikante Hemmung um 30

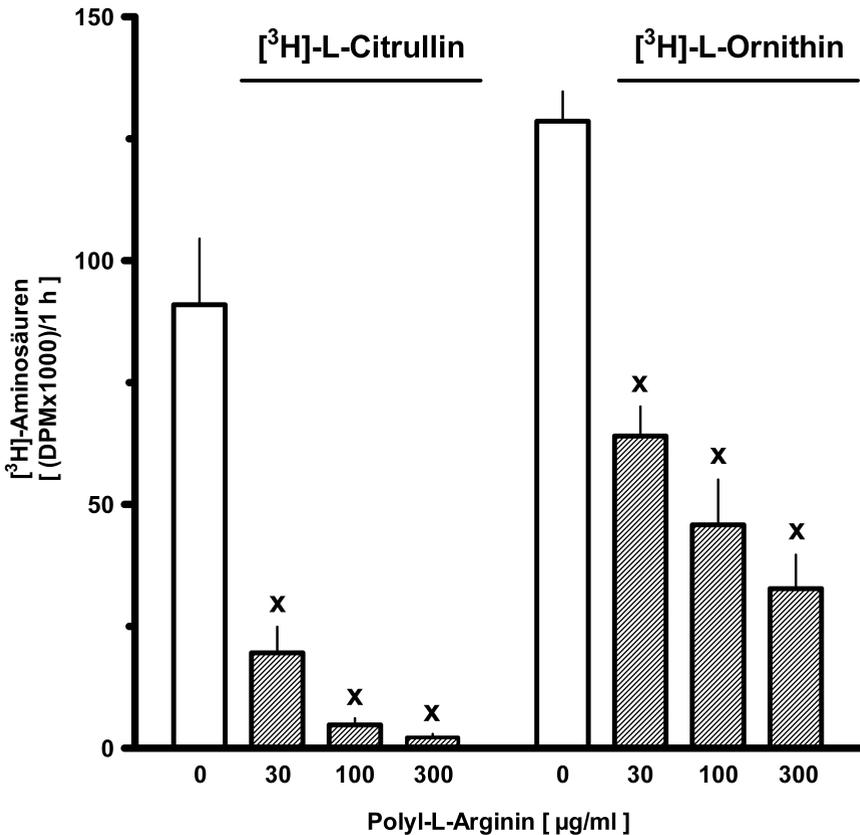
% bei Kontrollalveolarmakrophagen und 20 % bei durch LPS stimulierten Alveolarmakrophagen zu beobachten.



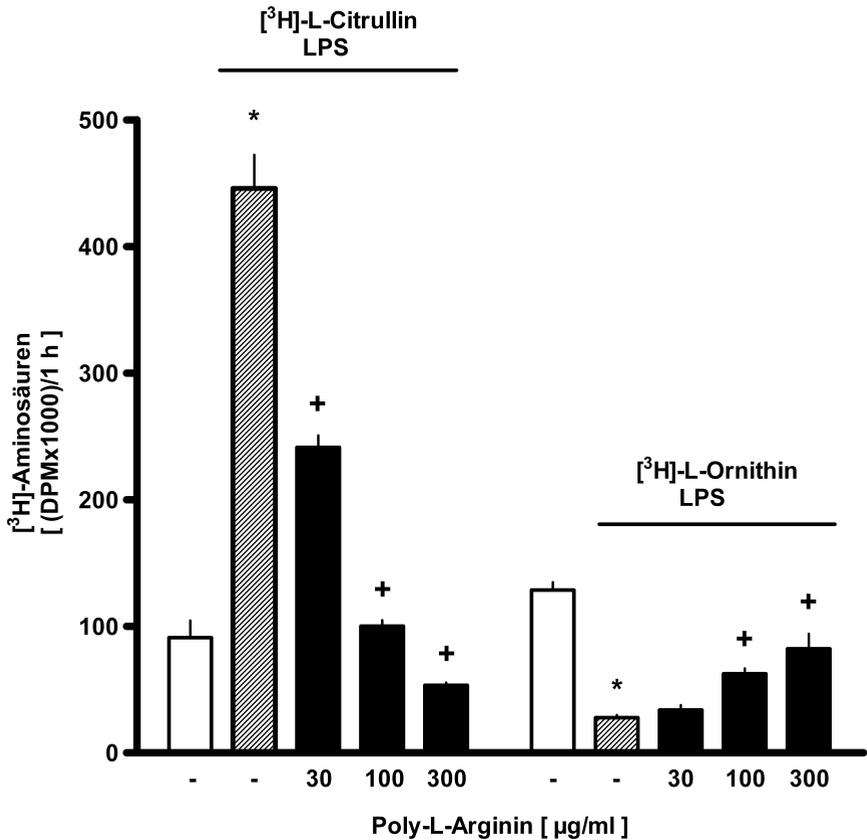
**Abb. 3: Abhängigkeit der NO-Bildung vom extrazellulären L-Argininangebot bei Alveolarmakrophagen der Ratte.** Alveolarmakrophagen wurden nach 20 Stunden Kultur in Anwesenheit oder Abwesenheit von LPS (1 µg/ml) für 6 Stunden in aminosäurefreier Krebs-HE-PES-Lösung, zu der wie angegeben 100 µM L-Arginin zugegeben wurde, inkubiert. Die Höhe der Säulen repräsentiert die nach sechs Stunden im Inkubationsmedium akkumulierte Menge Nitrit, angegeben in nmol pro  $10^6$  Zellen, Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n = 6$ . x:  $p < 0,01$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (Kontrolle heißt hier nicht durch LPS stimuliert); +:  $p < 0,01$  bezogen auf die jeweiligen Werte in Medium ohne L-Arginin.

### **3.3 Effekte von Polykationen auf den [<sup>3</sup>H]-L-Argininmetabolismus durch iNOS und Arginase in Alveolarmakrophagen**

Wenn Alveolarmakrophagen von Ratten, die 20 Stunden unter Kontrollbedingungen kultiviert worden waren, für 1 Stunde in Krebsmedium, das [<sup>3</sup>H]-L-Arginin (37 kBq/ml, 0,1 µM) enthielt, inkubiert wurden, konnte, wie bereits in früheren Studien dieser Arbeitsgruppe beobachtet (Hey et al. 1995; Hey et al., 1997), eine signifikante Menge von [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin und [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin im Inkubationsmedium nachgewiesen werden. Die Menge an Radioaktivität, die in der [<sup>3</sup>H]-L-Citrullinfraktion bzw. in der [<sup>3</sup>H]-L-Ornithinfraktion gefunden wurde, entsprach  $6,7 \pm 1,1\%$ , bzw.  $9,8 \pm 0,7\%$  der gesamten Menge zugegebenen Radioaktivität im Inkubationsmedium. Poly-L-Arginin hemmte bei Anwesenheit während der einstündigen Inkubationsperiode die Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin und [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin konzentrationsabhängig. Allerdings war der Effekt auf die Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin stärker, als der Effekt auf die Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin (siehe Abb. 4). Wenn während der Kultur LPS (1 µg/ml) anwesend war, wurde ca. die siebenfache Menge [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin gebildet und die [<sup>3</sup>H]-L-Ornithinmenge wurde um ca. 80 % reduziert. Unter diesen Bedingungen reduzierte Poly-L-Arginin wiederum konzentrationsabhängig die Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin, sogar unter die Menge, die von nicht durch LPS stimulierten Alveolarmakrophagen, gebildet wurde. Zusätzlich wurde mehr [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin gebildet, jedoch nicht soviel, wie in unbehandelten Alveolarmakrophagen (siehe Abb. 5).



**Abb. 4: Effekt von Poly-L-Arginin auf den [<sup>3</sup>H]-L-Argininmetabolismus** durch Arginase und NO-Synthase in Alveolarmakrophagen der Ratte. Alveolarmakrophagen der Ratte wurden nach 20 Stunden Kultur ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/Schale) für eine Stunde in aminosäurefreier Krebs-HEPES Lösung, die [<sup>3</sup>H]-L-Arginin (37 kBq,  $0,1 \mu\text{M}$ ) enthielt, mit oder ohne Poly-L-Arginin (in unter der Säule angegebener Konzentration) inkubiert. Danach wurde die in das Inkubationsmedium abgegebene Menge an [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin und [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin mittels HPLC separat bestimmt. Die Höhe der Säulen repräsentiert die Menge an [<sup>3</sup>H]-Aminosäuren in absoluten Zahlen ( $\text{DPM} \times 1000 / (2,5 \times 10^6)$  Zellen) als Mittelwert und SEM aus sechs bis neun Experimenten. x:  $p < 0,01$  verglichen mit den entsprechenden Werten in Abwesenheit von Poly-L-Arginin.



**Abb. 5: Effekt von Poly-L-Arginin auf den [<sup>3</sup>H]-L-Argininmetabolismus** durch Arginase und NO-Synthase in Alveolarmakrophagen der Ratte nach Stimulation mit LPS. Alveolarmakrophagen der Ratte wurden nach 20 Stunden Kultur in Abwesenheit oder Anwesenheit von LPS (1 µg/ml) für eine Stunde in aminosäurefreier Krebs-HEPES Lösung, die [<sup>3</sup>H]-L-Arginin (37 kBq, 0,1 µM) enthielt, mit oder ohne Poly-L-Arginin (in unter der Säule angegebener Konzentration) inkubiert. Danach wurde die in das Inkubationsmedium abgegebene Menge an [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin und [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin mittels HPLC separat bestimmt. Die Höhe der Säulen repräsentiert die Menge an [<sup>3</sup>H]-Aminosäuren in absoluten Zahlen (DPM x1000 / (2,5x10<sup>6</sup>) Zellen)

als Mittelwert und SEM aus sechs bis neun Experimenten. +  $p < 0,01$  verglichen mit den entsprechenden Werten in Abwesenheit von Poly-L-Arginin bei durch LPS stimulierten Zellen; \* $p < 0,001$  verglichen mit den entsprechenden Werten für nicht mit LPS stimulierten Zellen.

#### **4. Diskussion**

Es wurde bereits gezeigt, dass kationische Proteine, sowohl die aus eosinophilen Granulocyten stammenden MBP und ECP, als auch die synthetischen Proteine, Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin, Atemwegsüberempfindlichkeit („airway hyperresponsiveness“) verursachen (Coyle et al., 1993a; Coyle et al., 1995; Gundel et al., 1991; Uchida et al., 1993). Außerdem können sie an Atemwegsepithelzellen zytotoxische Effekte (Frigas et al., 1980; Motojima et al., 1989) und Veränderungen, ähnlich den bei Asthma beobachteten Veränderungen, hervorrufen (Frigas und Gleich, 1986). Deshalb wurde vermutet, dass Epithelveränderungen, von diesen geladenen Proteinen verursacht, eine Hauptursache für Atemwegsüberempfindlichkeit („airway hyperresponsiveness“) bei Asthma sind. Auf der anderen Seite gibt es zunehmend Hinweise, dass kationische Proteine die Funktion der Atemwege auch auf nicht cytotoxische Art beeinflussen. Überempfindlichkeit der Atemwege kann innerhalb einer Stunde nach Exposition gegen kationische Proteine, lange bevor morphologische Schäden am Epithel beobachtet werden können, festgestellt werden. Es gibt weitere Hinweise, dass kationische Proteine die Freisetzung von Mediatoren aus dem Epithel, die das Ansprechen der glatten Muskelzellen regulieren, beeinflussen (Coyle et al., 1993; Coyle et al., 1994; Prie et al., 1996). Zusätzlich scheinen kationische Proteine eine Freisetzung von Bradykinin, eine verstärkte Übermittlung parasymphatischer Signale und eine Aktivierung

sensorischer Nervenzellen zu bewirken (Costello et al., 1997; Coyle et al., 1994; Coyle 1995).

#### **4.1. Einfluss von kationischen Proteinen auf die L-Argininaufnahme**

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass kationische Proteine die zelluläre Aufnahme von L-Arginin in Alveolarmakrophagen der Ratte vermindern. Dieser Effekt wurde hier bei Alveolarmakrophagen der Ratte gezeigt. Angriffspunkt ist hier der CAT-2B. Ähnliche Effekte konnten durch diese Arbeitsgruppe auch für Trachealepithelzellen der Ratte sowie von Meerschweinchen gezeigt werden (Hirschmann et al., 1998), also für unterschiedliche Zellarten der Atemwegsmucosa zweier Spezies. Dies deutet auf eine generelle biologische Signifikanz des beschriebenen Effekts hin. Die Tatsache, dass dieser Effekt durch Heparin aufgehoben werden kann, legt die Vermutung nahe, dass die positive Ladung für die Effekte auf den CAT-2B Transporter wichtig ist.

Es konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass Poly-L-Arginin unter allen untersuchten Bedingungen den L-Arginintransport stärker hemmte als Poly-L-Lysin, somit also potenter ist. In dieser Studie wurden Alveolarmakrophagen von Ratten untersucht. An ihnen wurde zusätzlich gezeigt, dass auch MBP, das wie Protamin ein endogenes kationisches Protein ist, die L-Argininaufnahme hemmt. Da Protamin kommerziell erhältlich ist, kann es benutzt werden, um MBP in einigen in vitro Experimenten zu ersetzen (Van Scott et al., 1996).

##### **4.1.1 Erwägungen zur Potenz von MBP**

Die Effekte von Protamin und MBP sind in ihrer Stärke vergleichbar mit denen von Poly-L-Lysin, aber schwächer als die von Poly-L-Arginin. Aus ver-

schiedenen Gründen ist es möglich, dass MBP in seiner Potenz in den vorliegenden in vitro Experimenten unterschätzt wurde. Zunächst ist bekannt, dass MBP in Salzlösung bei physiologischem pH-Wert ausfällt. Für die vorliegenden Aufnahmeversuche mussten die Zellen jedoch bei physiologischem pH-Wert inkubiert werden, um die Vitalität der Zellen nicht zu gefährden. Zusätzlich könnte sich MBP an der Oberfläche der Kulturschalen ablagern. Solch ein Verlust durch Ablagerung hätte minimiert werden können, indem die Kulturschalen vorab mit z. B. Poly-L-Lysin behandelt worden wären. Weil Poly-L-Lysin selbst als ein effektiver Hemmstoff für die L-Argininaufnahme zu sehen ist (s.o.), scheint eine solche Vorabbehandlung hier nicht sinnvoll möglich zu sein.

#### **4.1.2. Erwägungen zur Potenz von Poly-L-Arginin**

Die größere hemmende Wirkung auf die L-Argininaufnahme von Poly-L-Arginin im Vergleich zu anderen kationischen Proteine, könnte neben der Ladung auch durch die strukturelle Ähnlichkeit zu L-Arginin und die dadurch größere Affinität zum L-Arginintransporter erklärbar sein. Nach Induktion der iNOS durch Vorbehandlung mit LPS im Kulturmedium und einem daraus folgenden erhöhten intrazellulären Bedarf an L-Arginin nahm die L-Argininaufnahme in die Alveolarmakrophagen deutlich zu. Durch diese Arbeitsgruppe konnte in der Folge gezeigt werden, dass die vermehrte Aufnahme von L-Arginin durch eine vermehrte Expression des CAT-2B ermöglicht wird und dabei auch eine erhöhte Spezifität für L-Arginin gegenüber anderen kationischen Aminosäuren zu beobachten ist. Hierzu mögen auch posttranslationale Veränderungen, z.B. Phosphorylierung, beitragen (Messeri Dreißig et al, 2000). Eine erhöhte Spezifität des Transporters für L-Arginin mag auch eine relativ stärkere hemmende Wirkung von Poly-L-Argi-

nin aufgrund größerer struktureller Ähnlichkeit, erklären. Entsprechend nahm die hemmende Potenz von Poly-L-Lysin auf die L-Argininaufnahme im Gegensatz zur Potenz von Poly-L-Arginin nach Stimulation durch LPS ab.

#### **4.2. Auswirkungen einer verminderten L-Argininaufnahme für die Zellen**

Obwohl L-Arginin für Säugetierorganismen keine essentielle Aminosäure ist, kann diese Aminosäure nur von einigen Säugetierzellen synthetisiert werden, wohingegen die anderen Zellen auf die Aufnahme aus dem Extrazellularraum angewiesen zu sein scheinen. Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die NO-Synthese durch Alveolarmakrophagen der Ratte von der Aufnahme von L-Arginin von außen in höchstem Maße abhängig ist (Hammermann et al., 1998). Dies konnte mit dieser Studie bestätigt werden, da sowohl eine Hemmung der L-Arginin Aufnahme als auch eine Hemmung der NO Synthese über eine Abnahme des in stöchiometrischem Äquivalent anfallenden L-Citrullin gezeigt werden konnte. Auch Trachealepithelzellen können auf exogenes L-Arginin angewiesen sein. Zwar wurde beobachtet, dass Trachealepithelzellen der Ratte L-Arginin aus L-Citrullin synthetisieren können, allerdings reicht dieser Stoffwechselweg nicht aus, die von den Zellen benötigten Mengen L-Arginin zu liefern, zumal nicht unter Bedingungen eines erhöhten Bedarfs, wie sie z.B. bei NO-Synthese oder Zellteilung vorliegen. Diese Überlegungen werden durch die Beobachtung gestützt, dass die Aktivität des L-Arginintransport in proliferierenden Trachealepithelzellen deutlich höher ist, als in konfluierten Kulturen (Racké et al., 1997a).

L-Arginin wird über spezifische Transporter für kationische Aminosäuren in die Zellen aufgenommen (Closs 1996; Malandro und Kilberg, 1996). Dieser Transporter transportiert außer L-Arginin auch andere kationische Aminosäuren wie L-Ornithin und die essentielle Aminosäure L-Lysin. Daher kann eine Hemmung dieses Transporters zu einer verminderten Verfügbarkeit von mehreren kationischen Aminosäuren führen und deshalb mehrere funktionelle Konsequenzen haben. Eine anhaltende Hemmung des Transports für kationische Aminosäuren kann zu einer gestörten Proteinbiosynthese führen, da L-Lysin und L-Arginin an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. L-Arginin ist darüber hinaus Substrat für zwei Stoffwechselwege, die NO-Synthese und den Arginin-Polyamin-Syntheseweg, die wichtige zelluläre und transzelluläre Mediatoren liefern. Ein Mangel an L-Arginin kann deshalb zu einer verminderten Synthese von NO und von L-Ornithin, das als Vorläufer für die Polyaminsynthese dient, führen. Die Hemmung des Transports kationischer Aminosäuren beeinflusst daher diese Stoffwechselwege sofort entscheidend, wie die vorliegenden Ergebnisse bestätigen.

#### **4.2.1 Wirkungen auf die NO-Synthese und den intrazellulären Metabolismus des L-Arginin durch Polykationen**

Tatsächlich zeigen die vorliegenden Experimente, dass Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin akut eine Verminderung der NO-Synthese bei Alveolarmakrophagen der Ratte verursachen. Der inhibierende Effekt von Poly-L-Arginin ist auch hier stärker, als der von Poly-L-Lysin. Wie bereits erwähnt, hängt die NO-Synthese bei Alveolarmakrophagen der Ratte stark von der zellulären Aufnahme von L-Arginin ab. Werden die Alveolarmakrophagen von Ratten in aminosäurefreier Krebs-HEPES-Lösung inkubiert, scheint die Verfügbarkeit an zellulärem L-Arginin sofort auf ein für die NO-Synthese

suboptimales Niveau zu sinken. Besonders dann, wenn durch vorausgehende Aktivierung der Alveolarmakrophagen mit LPS die iNOS induziert wurde, was zu einer erhöhten NO-Synthese und damit zu einem erhöhten L-Argininbedarf führt. Eine Zugabe von L-Arginin verursachte folgerichtig einen deutlichen Anstieg der NO-Synthese. Poly-L-Lysin hatte nur in den Experimenten einen inhibierenden Einfluss auf die NO-Synthese, bei denen L-Arginin anwesend war. Die NO-Synthese scheint direkt von der zellulären L-Argininaufnahme abzuhängen, da die Hemmung dieses Transports durch Poly-L-Lysin direkt funktionelle Konsequenzen für die NO-Synthese hat. Poly-L-Arginin dagegen hat schon in der Abwesenheit von L-Arginin einen hemmenden Effekt auf die NO-Synthese, welcher bei Anwesenheit von L-Arginin verstärkt wird.

Die Beobachtung des Metabolismus von [ $^3\text{H}$ ]-L-Arginin ergab die folgenden Ergebnisse. Rattenalveolarmakrophagen zeigten, wenn sie ohne LPS kultiviert und für eine Stunde in Krebs-HEPES-Medium, welches [ $^3\text{H}$ ]-L-Arginin enthielt, inkubiert wurden, eine deutliche Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Citrullin und [ $^3\text{H}$ ]-L-Ornithin, womit sich die Aktivität von NOS, bzw. Arginase beurteilen lässt. Poly-L-Arginin im Inkubationsmedium verursacht eine konzentrationsabhängige Verminderung der Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Citrullin und [ $^3\text{H}$ ]-L-Ornithin, wobei der Effekt auf die Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Citrullin relativ stärker war, als der auf die Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Ornithin. Eine Verminderung der Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Citrullin und [ $^3\text{H}$ ]-L-Ornithin kann durch eine Hemmung des L-Arginintransport durch Poly-L-Arginin erklärt werden. Übereinstimmend mit früheren Beobachtungen wird die Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Citrullin deutlich verstärkt und die Bildung von [ $^3\text{H}$ ]-L-Ornithin deutlich vermindert, wenn in den Alveolarmakrophagen große Mengen iNOS, durch LPS induziert, vorhan-

den ist. L-Arginin wird dann vorzugsweise durch die iNOS verstoffwechselt. Es wurde festgestellt, dass N<sup>G</sup>-OH-L-Arginin (Hecker et al., 1995; Hey et al., 1997), ein Zwischenprodukt der NO-Synthesereaktion von der iNOS freigesetzt wird und die Arginase inhibiert. Auch unter diesen Bedingungen verursacht Poly-L-Arginin eine deutliche Verminderung der Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin. Die Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin wurde verstärkt, ohne das Niveau der unter Kontrollbedingungen kultivierten Alveolarmakrophagen zu erreichen. Wird die Aufnahme von L-Arginin gehemmt, wie hier durch Poly-L-Arginin, kann die L-Argininkonzentration intrazellulär auf ein für die iNOS suboptimales Niveau sinken. Es wird dann auch weniger N<sup>G</sup>-OH-L-Arginin gebildet. Die Hemmung der Arginase nimmt ab, es wird mehr L-Arginin durch die Arginase zu L-Ornithin umgesetzt. Durch die Hemmung des L-Arginintransport durch Poly-L-Arginin bleibt die Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin unter der Bildung von [<sup>3</sup>H]-L-Ornithin durch Arginase bei Kontrollbedingungen.

Für die Unterhaltung entzündlicher Prozesse mit ggf. deutlicher Schädigung umliegender Gewebe dürfte auch die Tatsache wichtig sein, dass die iNOS unter L-Argininmangel mehr Hyperoxidanionen bildet. Diese reagieren mit NO, wie oben beschrieben, z. B. zu Peroxynitrit. Durch die Anwesenheit von Polykationen oder in vivo z.B. MBP, kann in stimulierten Alveolarmakrophagen ein solcher Substratmangel entstehen und dadurch der L-Argininmetabolismus in Richtung Peroxynitritbildung gelenkt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen für Alveolarmakrophagen von Ratten, dass verschiedene kationische Proteine, einschließlich MBP, einen inhibitorischen Einfluss auf den L-Arginintransport, der vornehmlich durch den CAT-2B erfolgt, haben. Dies führt zu einer verminderten Versorgung der von L-Arginin abhängigen Stoffwechselwege, hier gezeigt an der NO-Synthese durch iNOS. Die unterschiedliche inhibitorische Potenz von Poly-L-Arginin und Poly-L-Lysin legt nahe, dass neben der Ladung dieser Proteine auch spezifische Strukturen für die biologischen Effekte von kationischen Proteinen wichtig sind. Durch Poly-L-Arginin kann der Transport soweit blockiert werden, dass es intrazellulär zu einer Verlagerung der Stoffwechselwege kommt. Durch Aktivierung der Alveolarmakrophagen mit LPS kann die Aufnahme über CAT-2B, wie bei Makrophagen anderer Spezies, gesteigert werden (Shibazaki et al., 1996).

Die proinflammatorische Rolle der endogenen polykationischen Proteine MBP und ECP wird klarer. Zuvor konnte gezeigt werden, dass diese Proteine Atemwegsüberempfindlichkeit („airway hyperresponsivness“) auslösen können (Gundel et al., 1991). Durch die intrazelluläre Verminderung des L-Argininangebotes nimmt die Bildung aggressiver Radikale (z.B. Peroxynitrit) zu, die schließlich zu den bekannten Gewebeveränderungen führen können.

Die Rolle des NO ist ambivalent. NO hat beim Menschen eine erregerabwehrende Wirkung u. a. gegen Leishmanien, Mycobakterien und Plasmodien (Ricciardolo, 2003). Durch die durch eosinophile Granulozyten freigesetzten polykationischen Proteine wird die NO-Synthese durch Hemmung der L-Argininaufnahme moduliert. Es entsteht mehr L-Ornithin als Aus-

gangspunkt der Polyaminsynthese über den Arginaseweg und mehr proinflammatorisch wirkende Hydroperoxyanionen und damit mehr proinflammatorisch wirkendes Peroxynitrit. Gleichzeitig übt NO eine Feedback-Hemmung auf die Freisetzung proinflammatorischer Leukotriene aus (Brunn et al., 1997).

Dass es trotz der erhöhten Mengen NO bei Asthma (Kharitonov und Barnes, 1996) bekannterweise zu einer Bronchokonstriktion kommt, kann am Ort der NO-Freisetzung liegen (große bzw. kleine Atemwege). Auch ein vermindertes Ansprechen der Atemwege auf NO, z.B. durch eine Schädigung des Epithels durch Peroxynitrit, stellt eine mögliche Ursache dar. Durch eine Schädigung des Epithels durch NO, bzw. die Nebenprodukte der NO-Synthese, ist paradoxerweise ein NO-Mangel oder eine mangelnde Wirkung des NO an den Muskeln der Atemwege mit nachfolgender Konstriktion denkbar. Filep et al., (1993) wiesen an Trachealpräparaten vom Meerschwein eine wichtige „Mittlerrolle“ des Epithels nach. Relaxierend wirkende Substanzen wirkten nach Entfernung des Epithels konstriktorisch. Ob die hier in vitro beschriebenen Effekte in vivo eher antiinflammatorisch wirken oder ob der proinflammatorische Effekt durch eine vermehrte Peroxynitritbildung aufgrund intrazellulären Substratmangels für die iNOS überwiegt, bleibt zunächst Gegenstand weiterer Untersuchungen. Nicht berücksichtigt ist hier bis jetzt die Wirkung der Polykationen auf die cNOS und die im Epithel vorhandenen Transporter.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Alveolarmakrophagen der Ratte die iNOS und damit die NO-Synthese in hohem Maß von der L-Argininaufnahme abhängig ist. Eine Hemmung der Aufnahme von L-Arginin führt intrazel-

lulär zu einer Verlagerung der Stoffwechselwege für L-Arginin in Richtung der Arginase und der Hydroxylradikalbildung durch die iNOS (indirekt nachgewiesen). Der zuständige Transporter (vornehmlich) CAT-2B kann konzentrationsabhängig gehemmt werden.

Wenn es gelingt, den inhibitorischen Effekt auf die iNOS isoliert, d.h. ohne den cytotoxischen Effekt z. B. des MBP in Makrophagen auszulösen, eventuell mit speziellen Proteinen, bietet sich hier vielleicht eine neue Möglichkeit zur Therapie des Asthma bronchiale. Es wäre eventuell möglich, die von den Makrophagen freigesetzte Menge NO zu reduzieren, und damit auch die Menge der das Epithel schädigenden Radikale. Das Epithel würde geschützt und könnte seine Funktion weiter wahrnehmen. Eine Atemwegsüberempfindlichkeit träte vielleicht nur vermindert auf oder bliebe sogar ganz aus.

## 6. Literaturverzeichnis

- Albritton LM, Bowcock AM, Eddy RL, Morton CC, Tseng L, Farrer LA, Cavalli-Sforza LL, Shows TB, Cunningham JM. The human cationic amino acid transporter (ATRC1): physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics* 1992; 12: 430-434
- Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 1989; 57: 659-666
- Barnes PJ, Jonsson B, Klim JB. The costs of asthma. *Eur Respir J* 1996c; 9: 636-642
- Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16: 128-130
- Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax* 1996a; 51: 218-220
- Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1996b; 42: 3-10
- 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
- Bernareggi M, Mitchell JA, Barnes PJ, Belvis MG. Dual action of nitric oxide on airway plasma leakage. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 869-874
- Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacin M, Murer H. Expression cloning of cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine

an dibasic neutral amino acids. Proc Nat Acad Sci USA 1992; 89: 5601-5605

Bertran J, Werner A, Chillarón J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacin M. Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem 1993; 268: 14842-14849

Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S, Mann GE. L-Arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. Biochem J 1992; 284: 15-18

Bosquet JB, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med 1990; 323: 1033-1039

Bröer S, Bröer A, Hamprecht B. The 4F2hc surface antigen is necessary for expression of system y<sup>+</sup>-like neutral amino acid transport activity in C6-BU-1 rat glioma cells: evidence from expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. Biochem J 1995; 312: 863-870

Brunn G, Hey C, Wessler I, Racké K. Endogenous nitric oxide inhibits leukotriene B<sub>4</sub> release from rat alveolar macrophages. Eur J Pharmacol 1997; 326: 53-60

Christensen HN, Antonioli JA. Cationic amino acid transports in rabbit reticulocyte. J Biol Chem 1969; 244: 1497-1504

Closs EI. CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transports. Amino Acids 1996; 11: 193-208

- Closs EI, Albritton LM, Kim JW, Cunningham JM. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem* 1993a; 268: 7538-7544
- Closs EI, Gräf P, Habermeier A, Cunningham JM, Förstermann U. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 1997; 36: 6462-6468
- Closs EI, Lyons CR, Kelly C, Cunningham JM. Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters-identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem* 1993b; 268: 2079-20800
- Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13: 501-507
- Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD. Localisation of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M-2 muscarinic receptor function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; 17: L93-L103
- Coyle AJ, Ackermann SJ, Burch R, Proud D, Irvin CG. Human eosinophil-granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. *J Clin Invest* 1995; 95: 1735-1740
- Coyle AJ, Ackermann SJ, Irvin CG. Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am Rev Respir Dis* 1993a; 147: 896-900

- Coyle AJ, Ackermann SJ, Uchida D, Mitzner W, Irvin CG. Role of cationic proteins in the airway Hyperresponsiveness due to airway inflammation. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 150: S63-S71
- Coyle AJ, Mitzner W, Irvin CG. Cationic proteins alter smooth muscle function by an epithelium-dependent mechanism. *J Appl Physiol* 1993; 74:1761-1768
- Coyle AJ, Perretti F, Manzini S, Irvin CG. Cationic protein induced sensory nerve activation. *J Clin Invest* 1994; 94: 2301-2306
- De Boer JH, Meurs H, Coers W, Koopman AE, Visser AC, Timens W, Zaagsma J. Deficiency of nitric oxide in allergen induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1109-1116
- Devés R, Angelo S, Chávez P. N-Ethylmaleimide discriminates between two lysin transport systems in human erythrocytes. *J Physiol (Lond)* 1993; 468: 753-766
- Devés R, Boyd CAR. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol Rev* 1998; 78: 487-545
- Devés R, Chávez P, Boyd CAR. Identification of a new transport system ( $\gamma^L$ ) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol (Lond)* 1992; 468: 753-766
- Dorger M, Jesch NK, Rieder G, Hirvonen MR, Savolainen K, Krombach F, Messmer K. Species differences in NO formation by rat and hamster alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 413-420
- Durham SR, Kay AB. Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clin Allergy* 1995; 15: 411-418

- Fei YJ, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. The amino acid transport system y<sup>+</sup>L induced in *Xenopus laevis* oocytes by human chorioncarcinoma cell (JAR) mRNA is functionally related to the heavy chain for the 4F2 cell surface antigen. *Biochemistry* 1995; 34: 8744-8751
- 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(3): 637-644
- Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 352: 351-364
- Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1788-1792
- Freitag A, Reimann A, Wessler I, Racké K. Effects of bacterial lipopolysaccharides (LPS) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on rat tracheal epithelial cell in culture: morphology, proliferation and induction of NO synthase. *Pulm Pharmacol* 1996; 9: 149-156
- Frigas E, Gleich GL. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 527-537
- Frigas E, Loegering DA, Gleich GL. Cytotoxic effect of guinea-pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 1980; 42: 35-43
- Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leucocyte. *Annu Rev Med* 1993; 44: 85-101

- Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide Synthases: Properties and Catalytic Mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 707-36
- Gundel RH, Letts LG, Gleich GJ. Human eosinophil major basic protein induces airway hyperresponsiveness in primates. *J Clin Invest* 1991; 87: 1470-1473
- Hammermann R, Bliesener N, Mössner J, Klasen S, Wiesinger H, Wessler I, Racké K. Inability of rat alveolar macrophages to recycle L-citrulline to L-arginine despite induction of arginosuccinate synthetase mRNA and protein, and inhibition of nitric oxide synthesis by exogenous L-citrulline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358: 601-607
- Hammermann R, Brunn G, Racké K. Analysis of the genomic organization of the human cationic amino acid transporters CAT-1 CAT-2 and CAT-4. *Amino acids* 2001; 21(2): 211-219
- Hecker M, Nematiollahi H, Hey C, Busse R, Racké K. Inhibition of arginase by N<sup>ε</sup>-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 1995; 359: 251-254
- Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Gouff S, G. Ketterer, Wessler I, Racké K. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N<sup>ω</sup>-hydroxy-D, L-indospicine, 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351: 351-359

- Hirschmann J, Hey C, Hammermann R, Folkerts FP, Nijkamp, Gleich GJ, Wessler I, Racké K. Inhibition of L-arginine transport in rat and guinea-pig alveolar macrophages by poly-cationic peptides. *Br J Pharmacol* 1998; 123: 42
- Hosokawa H, Sawamura T, Kobayashi S, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. Cloning and characterization of brain-specific cationic amino acid transporters. *J Biol Chem* 1997; 272: 8717-8722
- Ignaro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269
- Jorens PG, Van Overveld FJ, Bult H, Vermeire PA, Herman AG. L-Arginine-dependent production of nitrogen oxides by rat pulmonary macrophages. *Eur J Pharmacol* 1991; 200: 205-209
- Kakuda DK, Finley KD, Dionne VE, MacLeod CL. Two distinct gene products mediate  $y^+$  type cationic amino acid transport in *Xenopus* oocytes and show different tissue expression patterns. *Transgene* 1993; 1: 91-101
- Kavanaugh MP, Wang H, Zang Z, Zang W, Wu YN, Dechant E, Naort RA, Kabat D. Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family. *J Biol Chem* 1994; 268: 15445-15450
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Nitric oxide in exhaled air is an new marker of airway inflammation. *Monaldi Arch Chest Dis* 1996; 51: 533-537
- Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 1991; 352: 725-728

- Kraneveld AD, Folkerts G, Van Oosterhout AJ, Nijkamp FP. Airway hyper-responsiveness: first eosinophils and then neuropeptides. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 517-527
- Lamadue JA, Glick AB, Ruddle FH. Cloning, Sequence analysis und expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987; 84: 9204-9208
- László F, Whittle BJ, Evans SM, Moncada S. Association of microvascular leakage with induction of nitric oxide synthase: effects of nitric oxide synthase inhibitors in various organs. *Eur J Pharmacol* 1995; 283: 47-53
- MacLeod CL, Fong AM, Seal BS, Walls LM, Wilkinson F. Isolation of novel murine thymocyte cDNA clones: one encodes a putative multiple membrane spanning protein. *Cell Growth Differ* 1990; 1: 271-279
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-50
- Malandro MS, Kilberg MS. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 305-336
- Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled Nitric Oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 998-1002
- Messeri-Dreissig MD, Hammermann R, Moessner J; Goethert M, Racké K. In rat alveolar macrophages lipopolysaccharides exert divergent effects on the transport of the cationic amino acids l-arginine and l-ornithine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361: 621-628

- Meurs H, Schuurmann FE, Duyvendak M, Zaagsma J. Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 559-62
- Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 450-55
- Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994; 266: *E829–E839*
- Motojima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GL. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea-pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 801-805
- Nijkamp FP, Van der Linde HJ, Folkerts G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea-pig in vivo and in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 727-734
- Palacin M. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of transport function. *J Exp Biol* 1994; 196: 124-137
- Parmacek MS, Karpinsky BA, Gottesdiener KM, Thompson CB, Leiden CB. Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 1915-1931
- Prie S, Conroy DM, Gleich GJ, Sirois P. Eosinophils and neutrophils modify arachidonic acid-induced relaxation of guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 1996; 317: 343-351
- Puppi M, Henning SJ. Cloning of the rat ecotropic retroviral receptor and studies of its expression in intestinal tissue. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 38-45

- Quackenbusch E, Clabby M, Gottesdiener KM, Barbosa J, Jones NH, Strominger JL, Spech S, Leiden JM. Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type two membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987; 84: 6526-6530
- Racké K, Hey C, Stichnote C, Freitag A, Brüss M, Bönisch H, Wessler I. Characterisation of L-arginine transport in rat tracheal epithelial cells in culture. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356: R23
- Racké K, Wessler I, Brunn G. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1996; 17: 147-148
- Racké L, Hey C, Mössner J, Hammermann R, Stichnote C, Wessler I. Activation of L-arginine transport by protein kinase C in rabbit, rat and mouse alveolar macrophages. *J Physiol* 1998; 511: 813-825
- Ricciardolo M. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58:175-182
- Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol rev* 2004; 84: 731-765
- Ricciardolo FL, Zaagsma J, Meurs H. The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 1221-1231
- Saleh, D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 1998; 12: 929-937

- Schmidt HHW. NO, endogener Botenstoff und Zellgift. *Med Mo Pharm* 1994; 17: 168-185
- Schmidt HHHW, Nau H, Wittforth W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Böhme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium derived relaxing factor. *Eur J Pharmacol* 1988; 154: 213-216
- Shibazaki T, Fujiwara M, Sato H, Fujiwara K, Abe K, Bannai S. Relevance of the arginine transport activity to the nitric oxide synthesis in mouse peritoneal macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1311: 150-154
- Simmons W, Closs E, Cunningham J, Smith TW, Kelly RA. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 11694-11702
- Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 1986; 137: 2913-2917
- Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 749-790
- ten Hacken NH, Timens W, van der Mark TW, Nijkamp FP, Postma DS, Folkerts G. Nitric oxide and asthma. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1999; 143: 1606-1611
- Teixeira S, Digrandi S, Kuhn LC. Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus. *J Biol Chem* 1987; 262: 9574-9580
- Uchida DA, Ackermann SJ, Coyle AJ, Larsen GL, Weller PF, Freed J, Irvin CG. The effect of human eosinophil granule major basic protein on

- airway responsiveness in the rat in vivo: a comparison with polycations. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 982-988
- Van Scott MR, Smith MD, Welch CA, Bentzel C, Metzger WJ. Bioelectric response of human nasal epithelial cells to polycationic protein. *Am J Physiol* 1996; 271: L159-L165
- Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. Na<sup>+</sup>-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 1988; 263: 3150-3163
- Van Winkle LJ, Christensen HN, Campione AL. Na<sup>+</sup>-dependent transport of basic, zwitterionic and bicyclic amino acids by broad scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem* 1985; 260: 12118-12123
- Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D. Cell-surface receptor for ecotropic urine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 1991; 352: 729-731
- Wang WW, Jenkinson CP, Griscavage JM, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, Cederbaum SD, Ignaro LJ. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 1009-1016
- Wells RG, Hediger MA. Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5596 - 5600
- Wu JY, Robinson D, Kung HJ, Hatzoglou M. Hormonal regulation of the gene for the type C ecotropic retrovirus receptor in rat liver cells. *J Virol* 1994; 68: 1615-1623

- Yao SY, Muzyka WR, Elliot JF, Cheesman CI, Young JD. Cloning and functional expression of cDNA from rat jejunal epithelium encoding a protein (4F2hc) with  $\gamma^+$ L amino acid transport activity. *Biochem J* 1998; 330: 745-752
- Yoshimoto T, Yoshimoto E, Muruelo D. Molecular cloning and characterization of a novel human gene homologous to the murine ecotropic retroviral receptor. *Virology* 1991; 185: 10-15