

Aus dem Pharmakologischen Institut der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Substratversorgung von NO-Synthasen:  
Bedeutung von Membrantransportern und  
intrazellulären Arginin-Quellen

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

**Alexandra Simon**  
geboren am 27.02.1975  
in Kirchen/Sieg

Mainz, 2005

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

04.08.2005

MEINER FAMILIE!

*Die Neugier steht immer an erster Stelle  
eines Problems, das gelöst werden will.*

**GALILEO GALILEI (1564 - 1642)**

**ITALIENISCHER PHYSIKER UND ASTRONOM**

# **Danksagung**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>NO: Entdeckung, Synthese und Funktion.....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Isoformen der NO-Synthasen.....	2
1.1.2	Mechanismus der NO-Synthese aus Arginin.....	7
1.1.3	NO-Synthasen können weitere Radikale produzieren.....	8
1.1.4	Inhibitoren der NO-Synthasen.....	8
<b>1.2</b>	<b>Arginin .....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Arginin-Metabolismus.....	9
1.2.2	Pathophysiologische Bedingungen durch Arginin-Limitierung.....	12
1.2.2.1	Der endogene NOS-Inhibitor ADMA .....	12
<b>1.3</b>	<b>Aminosäure- und Peptidtransport .....</b>	<b>14</b>
1.3.1	Transport-Systeme für Arginin .....	14
1.3.1.1	Humane CATs .....	17
1.3.2	Transportsysteme für Glutamin.....	19
1.3.3	Peptid-Transporter .....	22
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>26</b>
2.1.1	Laborgeräte.....	26
2.1.2	Plastikwaren.....	28
2.1.3	Materialien für die Zellkultur .....	28
2.1.4	Weitere Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.5	Chemikalien .....	29
2.1.6	Enzyme und Kits .....	31
2.1.7	Oligonukleotide .....	32
2.1.7.1	Oligonukleotide .....	32
2.1.7.2	TaqMan Sonden.....	34
2.1.8	Plasmide .....	36
2.1.9	Software .....	36

<b>2.2</b>	<b>Methoden der Zellkultur .....</b>	<b>37</b>
2.2.1	Allgemeine Bedingungen .....	37
2.2.2	Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	38
2.2.3	Kulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien.....	39
2.2.3.1	A673.....	39
2.2.3.2	DLD-1.....	39
2.2.3.3	EA.hy 926 .....	40
2.2.3.4	ECV 304 / ECV 304 N-III-2 .....	40
2.2.3.5	HaCaT.....	40
2.2.3.6	HEK-GC.....	41
2.2.3.7	HUVEC .....	41
2.2.3.8	NB-OK-I .....	41
2.2.3.9	NT-2.....	41
2.2.3.10	RFL-6 .....	42
2.2.3.11	SK-N-MC .....	42
2.2.3.12	TGW-nu-I.....	42
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	42
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten.....</b>	<b>43</b>
2.3.1	Reagenzien und häufig verwendete Standardmethoden.....	43
2.3.1.1	Puffer und Lösungen.....	43
2.3.1.2	Molekularbiologische Standardmethoden .....	45
2.3.1.2.1	Agarosegelelektrophorese .....	45
2.3.1.2.2	Phenolextraktion .....	45
2.3.1.2.3	Präzipitation von Nukleinsäuren .....	46
2.3.1.2.4	Fotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	46
2.3.2	Isolation von Gesamt-RNA.....	47
2.3.2.1	RNA-Isolation aus Zellen mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ von QIAGEN .....	47
2.3.2.2	Saure Phenolextraktion.....	47
2.3.3	<i>In vitro</i> -Transkription.....	48
2.3.3.1	Plasmid-Linearisierung und Aufreinigung des Restriktionsansatzes	49
2.3.3.2	Transkriptionsreaktion.....	49
2.3.3.3	Aufreinigung der <i>in vitro</i> -Transkripte .....	50
2.3.3.4	Berechnung der Molekülzahl am Beispiel von hCAT-1 .....	50
2.3.4	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	51
2.3.4.1	Quantitative „real time“ RT-PCR (qRT-PCR) .....	52

<b>2.4</b>	<b>Biochemische Arbeiten auf Proteinebene .....</b>	<b>57</b>
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationen .....	57
2.4.2	Aktivitätsbestimmungen der NO-Synthase.....	58
2.4.2.1	Lösungen .....	58
2.4.2.2	RFL-6-Reporterzell-Assay.....	60
2.4.2.3	Radioimmuno-Assay (RIA).....	62
2.4.2.4	“NO-Analyzer” .....	63
2.4.3	HPLC-Analyse zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäure- Konzentrationen .....	65
2.4.3.1	Lösungen .....	65
2.4.3.2	HPLC-Bedingungen .....	67
2.4.3.3	Durchführung der HPLC-Messung .....	68
2.4.4	Auftrennung von L-[ <sup>14</sup> C]-Citrullin zu L-[ <sup>14</sup> C]-Arginin durch Dünnschichtchromatographie.....	71
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1</b>	<b>Substratversorgung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) .....</b>	<b>73</b>
3.1.1	Substratversorgung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in EA.hy926 Endothelzellen .....	73
3.1.1.1	Nachweis der Expression von hCAT mittels quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR).....	73
3.1.1.2	Vorversuche in EA.hy926 zur eNOS-Aktivität .....	77
3.1.1.2.1	Spezifität der NO-Messung.....	77
3.1.1.2.2	SOD-Abhängigkeit der NO-Produktion .....	79
3.1.1.3	Charakterisierung der ersten intrazellulären Arginin-Quelle: Recycling von Citrullin zu Arginin in EA.hy926.....	81
3.1.1.3.1	Zeitabhängige Regeneration der eNOS-Aktivität .....	81
3.1.1.3.2	Glutamin induziert eine Hemmung der NO-Produktion.....	82
3.1.1.3.3	Citrullin kann zurück zu Arginin regeneriert werden.....	85
3.1.1.3.4	Der Austausch von extrazellulärem Glutamin gegen intrazelluläres Citrullin wird vermutlich über den System N Transporter SN1 vermittelt.....	88
3.1.1.4	Charakterisierung der zweiten intrazellulären Arginin-Quelle: Proteinabbau in EA.hy926 .....	97
3.1.1.4.1	Hemmung des Proteinabbaus führt zu einer Reduktion der eNOS-Aktivität unter Substratmangel .....	97
3.1.1.4.2	Einschränkung der aus Proteinabbau stammenden Substratquelle durch Depletion der Peptide .....	99



3.1.2	Substratversorgung der eNOS in primären Endothelzellen (HUVEC)...	101
3.1.2.1	Die Konversion von Citrullin zu Arginin stellt eine Arginin-Quelle in primären Endothelzellen dar .....	102
3.1.2.1.1	Citrullin kann nur in Kombination mit Aspartat zu Arginin recycelt werden.....	103
3.1.2.1.2	Histidin induziert in HUVEC eine Substratdepletion.....	104
3.1.3	Substratversorgung der transfizierten endothelialen NO-Synthase in ECV-304.....	108
3.1.3.1	Existiert eine intrazelluläre Arginin-Quelle auch in ECV-304.....	109
3.1.3.1.1	eNOS in ECV 403 Zellen ist abhängig von extrazellulärem Arginin .....	109

## **3.2 Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase (nNOS) ..... 111**

3.2.1	Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase in A673 Neuroepitheliumzellen.....	111
3.2.1.1	Nachweis der Expression von hCAT mittels quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR).....	111
3.2.1.2	Vorversuche in A673 zur nNOS-Aktivität .....	113
3.2.1.2.1	Spezifität der NO-Messung und nNOS-Expression .....	113
3.2.1.2.2	SOD-Abhängigkeit der NO-Produktion .....	115
3.2.1.2.3	Einsatz des intrazellulären Sauerstoff-Radikalfängers Tempol..	117
3.2.1.3	Ist das Recycling von Citrullin zu Arginin ebenfalls eine intrazelluläre Arginin-Quelle für die nNOS in A673? .....	118
3.2.1.3.1	Keine zeitabhängige Regeneration der nNOS-Aktivität .....	118
3.2.1.3.2	Aus Citrullin regeneriertes Arginin kann nicht zur NO-Synthase genutzt werden .....	120
3.2.1.4	In A673 Neuroepitheliumzellen stellt der Proteinabbau die einzige intrazelluläre Arginin-Quelle für die nNOS dar .....	127
3.2.1.4.1	Hemmung des Proteinabbaus führt zur Reduktion der nNOS-Aktivität .....	127
3.2.1.4.2	Der Peptid-Histidin-Transporter PHT1 ist in A673 Zellen exprimiert.....	129
3.2.2	Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase in TGW-nu-I ^ Neuroblastomzellen .....	133
3.2.2.1	Vorversuche in TGW-nu-I zur nNOS-Aktivität .....	133
3.2.2.1.1	Spezifität der NO-Messung.....	133
3.2.2.2	TGW-nu-I Zellen können aus Citrullin regeneriertes Arginin zur NO-Synthase nutzen.....	135

3.2.2.2.1	Trotz moderater Expression des System N Transporters SN1 kann Glutamin die NO-Synthese in TGW-nu-I nicht zusätzlich beeinflussen .....	136
3.2.2.3	In TGW-nu-I Neuroblastomzellen stellt der Proteinabbau eine weitere intrazellulären Arginin-Quelle für die nNOS dar.....	138
3.2.3	Charakterisierung von weiteren nNOS-exprimierenden Zelllinien .....	140
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>141</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Substratversorgung der endothelialen NO-Synthese .....</b>	<b>141</b>
4.1.1	Reduktion der eNOS-Aktivität durch Glutamin: Depletion der für das Recycling notwendigen Aminosäure Citrullin .....	147
4.1.2	Proteinabbau als zweite intrazelluläre Argininquelle .....	149
4.1.2.1	Einschränkung der intrazellulären Substratquelle aus Proteinabbau durch Depletion der Peptide? .....	149
4.1.3	Ist eine Kolo-kalisation der Arginin-generierenden Enzyme und eNOS notwendig, um die Substratversorgung zu garantieren? .....	151
4.1.4	Schlussfolgernde Darstellung der Substratversorgung der eNOS .....	152
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der Substratversorgung der neuronalen NO-Synthese .....</b>	<b>153</b>
4.2.1	Die Bereitstellung des Substrates Arginin aus dem Recyclingweg zur Synthese von nNOS-generiertem NO ist abhängig vom Zelltyp.....	156
4.2.2	Proteinabbau als intrazelluläre Argininquelle zur Substratversorgung in nNOS exprimierenden Zellen .....	158
4.2.3	Optimierung der NO-Synthese in nNOS-exprimierenden Zellen .....	159
4.2.4	Schlussfolgernde Darstellung der Substratversorgung der nNOS .....	159
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von endogenen Methylargininen auf die NO Synthese.....</b>	<b>160</b>
4.3.1	Einfluss von endogenen Methylargininen auf NO-Synthasen .....	160
4.3.2	Akkumulation von ADMA aus Proteinabbau und Einfluss auf die endotheliale NO-Synthese .....	161
4.3.3	Die Bedeutung von ADMA in neurodegenerativen Erkrankungen.....	164
<b>4.4</b>	<b>Ausblick und weiterführende Experimente .....</b>	<b>166</b>
4.4.1	Substratversorgung der eNOS und nNOS .....	166

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>169</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>171</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>174</b>
<b>8</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>202</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>207</b>

# 1 Einleitung

NO ist ein wichtiges Signalmolekül aus Arginin, das durch die drei Isoformen der NO-Synthase (EC 1.14.13.39), die als konstitutiv bezeichnete endotheliale und neuronale Isoform (eNOS und nNOS) und die durch Zytokine induzierbare iNOS, gebildet wird. Die Bereitstellung des Substrates Arginin kann unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen für die Geschwindigkeit der NO-Produktion bei allen drei NO-Synthasen (NOS) entscheidend sein. Frühere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Arginin-Quellen, die der jeweiligen NOS-Isoform zur Verfügung stehen, unterschiedlich sind. Während die induzierbare NOS (iNOS) ihr Substrat ausschließlich aus einem Reservoir bezieht, das über Membrantransporter mit dem Extrazellulärraum im Austausch steht, hat die endotheliale NOS (eNOS) Zugang zu zwei Arginin-Quellen. Die erste Quelle steht über Membrantransporter wie dem cationischen Aminosäuretransporter-1 (CAT-1; System  $\gamma^+$ ) oder 4F2hc/ $\gamma^+$ LAT2 (System- $\gamma^+$ L) mit dem Extrazellulärraum im Austausch (Closs et al. 2000). Beide Transporter sind in Endothelzellen exprimiert und katalysieren den Austausch von basischen Aminosäuren (Gräf et al., 2001; Sala et al., 2002). 4F2hc/ $\gamma^+$ LAT2 vermittelt darüber hinaus den Austausch von extrazellulären neutralen Aminosäuren gegen intrazelluläre basische Aminosäuren (Broer et al., 2000). Im Gegensatz zu der ersten Quelle steht die zweite nicht über Membrantransporter mit basischen Aminosäuren im Extrazellulärraum in Verbindung.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun diese zweite intrazelluläre Arginin-Quelle für eNOS in Endothelzellen näher charakterisiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Identifizierung der Substratversorgung für die neuronale NOS (nNOS): erhält sie ihr Substrat vornehmlich über Membrantransporter oder auch aus einer möglichen intrazellulären Arginin-Quelle?

## 1.1 NO: Entdeckung, Synthese und Funktion

### 1.1.1 Isoformen der NO-Synthasen

Neben der in dieser Arbeit gebrauchten Benennung der NOS-Isoformen nach dem Organ oder dem exprimierenden Zelltyp, in dem sie initial identifiziert wurden bzw. nach Induzierbarkeit des Enzyms, existieren auch andere Nomenklaturen, z.B. nach der Reihenfolge ihrer Aufreinigung (Förstermann und Kleinert, 1995).

Die beiden konstitutiven Isoformen eNOS und nNOS sind bei einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration voll aktiv, die physiologisch im Cytoplasma nicht erreicht wird (Okada, 1995; Ruan et al., 1996), da in endoplasmatischem Reticulum (ER), Mitochondrien und Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen aktiv sind. Diese Konzentration wird im Cytosol in der Regel nur transient durch einen Rezeptor-vermittelten Calcium-Einstrom erreicht, bei der die Calcium-Konzentration um mehr als das 100 fache von unter  $10^{-8}$  mol/L auf etwa  $10^{-6}$  mol/L ansteigt. Die NOS ist aufgrund dessen nur wenige Minuten aktiv („low-output“ Enzym). Die induzierbare NOS (iNOS) hingegen kann bei ausreichender Substratversorgung und wiederholter Induktion über mehrere Tage große Mengen NO bilden („high-output“ Enzym) und Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten und Tumorzellen abtöten (MacMicking et al., 1997). Sie ist weitgehend  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Die verschiedenen NOS-Isoformen werden durch 3 Gene kodiert, die auf den Chromosomen 7, 12 und 17 lokalisiert sind. Ihnen gemein ist, dass die NO-Produktion aus der Oxidation des Guanidino-Stickstoffs von Arginin hervorgeht, bei der molekularer Sauerstoff und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Co-Substrat benötigt werden. Alle Isoformen enthalten Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und ein Häm-Eisen als prosthetische Gruppe und benötigen den Co-Faktor Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) (Förstermann und Kleinert, 1995).

Nitroglycerin wird bereits seit über 100 Jahren zur Behandlung von Angina Pectoris eingesetzt, der dahinter stehende Reaktionsmechanismus jedoch konnte erst in den letzten Jahrzehnten aufgeklärt und dem Stickstoffmonoxid (NO) sowie zyklischem GMP (cGMP) zugeordnet werden. NO war zuvor nur als sehr reaktives und giftiges Gas mit einer Dichte von 1,34 g/l bekannt, das als unerwünschte Begleiterscheinung bei Verbrennungsvorgängen entsteht, und so z.B. in Autoabgasen vorkommt.

Robert F. Furchgott gilt als der eigentliche Entdecker des EDRF („endothelium derived relaxing factor“), dem Entspannungsfaktor des Endothels (Furchgott und Zawadzki, 1980; Cherry et al., 1982; Furchgott et al., 1984). Furchgott und seine Mitarbeiter wiesen Anfang der 80er Jahre erstmals nach, dass in Endothelzellen diese kontinuierlich freigesetzte gefäßerweiternde Substanz eine wesentliche Rolle bei der Gefäßrelaxation spielte. Die Gruppe von Louis J. Ignarro fand bereits 1979, dass die Relaxation einer bovinen Koronar-Arterie durch NO mit einem Anstieg an cGMP assoziiert war (Gruetter et al., 1979). Ferid Murad hatte bereits Ende der 70er Jahre auf eine Steuerungsfunktion von NO für Körperzellen hingewiesen, allerdings gab es zu wenig Experimente, die seine Idee empirisch unterstützten. Er fand, dass NO ein potenter Stimulator der G-Cyklase war und dass eine Reihe von Agentien wie Nitroglycerin cGMP-Spiegel erhöhten (Murad et al., 1978 und 1979; Arnold et al., 1977). Jedoch brachte zu dieser Zeit niemand EDRF mit dem freien Radikal NO in Verbindung. Ignarro gelangte schließlich 1987 unabhängig von Furchgott zur Erkenntnis, dass EDRF und NO identisch sind (Ignarro et al., 1986; Ignarro et al., 1987 und 1988; Furchgott, 1988). Moncada und Mitarbeiter nahmen ebenfalls 1987 an, dass EDRF und NO identisch seien (Palmer et al., 1987). Ein Jahr später entdeckten sie, dass die Quelle des endothelialen NO der Guanidin-Stickstoff des Arginins war und das Enzym, das für die NO-Synthese verantwortlich ist, eine Oxygenase sein muss: heute bekannt als die endotheliale Isoform der NOS, eNOS (Palmer et al., 1988).

1998 erhielten Furchgott, Ignarro und Murad den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für die Erforschung der Wirkungen von NO als Signalmolekül im menschlichen Herz-Kreislauf- und Gefäßsystem. NO diffundiert mit einer Geschwindigkeit von 50  $\mu\text{m/s}$  in biologischen Systemen (Gally et al., 1990). Es reguliert beispielsweise den Blutdruck durch Entspannung der Muskulatur der Blutgefäße und spielt eine wichtige Rolle beim Lernen und Erinnern. Diese Prozesse werden über die Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase (Arnold et al., 1977) und einer darauffolgenden GMP-abhängigen Proteinphosphorylierungskaskade oder der Freisetzung von Neurotransmittern vermittelt. Nach Aktivierung von Makrophagen kommt es zu einer vermehrten NO-Freisetzung durch die induzierbare NOS. NO diffundiert zu Zielzellen, wie z.B. Tumorzellen, Bakterien oder Pilzen und fungiert dort als Abwehrmechanismus gegen Infektionen, indem es mit Eisen-Schwefel-Zentren in Schlüsselenzymen reagiert (Moncada und Higgs, 2002). NO kann auch direkt Proteine nitrieren oder nitrosylieren und so deren biologische Funktion verändern.

Die eNOS wurde als Erstes in Endothelzellen der Rinderaorta gefunden, aufgereinigt und charakterisiert (Förstermann et al., 1991; Pollock et al., 1991). Ein Jahr später konnten cDNAs sowohl der bovinen als auch der humanen eNOS von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und charakterisiert werden (Lamas et al., 1992; Marsden et al., 1992; Janssens et al., 1992). Die endotheliale NOS ist ebenso wie die neuronale ein konstitutives,  $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängiges „low-output“-Enzym, das überwiegend in Endothelzellen exprimiert wird (Pollock et al., 1993). In den folgenden Jahren konnte sie jedoch in einer großen Anzahl nicht-endothelialer Zellen entdeckt werden: in bestimmten Neuronen (Abe et al., 1997; Dinerman et al., 1994), Osteoblasten (Helfrich et al., 1997), Fibroblasten (Wang et al., 1996), Keratinozyten (Shimizu et al., 1997), Lungenepithelzellen (Shaul et al., 1994), Nierenepithelzellen (Tracey et al., 1994), Spermien (Zini et al., 1996), T-Zellen (Reiling et al., 1996), Hepatozyten (Zimmermann et al., 1996), Kardiomyozyten (Balligand et al., 1995), Thrombozyten (Sase und Michel, 1995; Wallerath et al., 1997) und Megakaryozyten (Wallerath et al., 1997).

Aus Endothel freigesetztes NO ist ein physiologisch wichtiger Vasodilator, der zudem die Plättchen-Aggregation und Adhäsion verhindert. Vaskuläres NO verhindert weiterhin die Leukozyten-Adhäsion am Endothel und inhibiert die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Übersicht: Förstermann et al., 1993 und 1994).

Die nNOS wurde zuerst in Neuronen des Ratten- und Schweine-Cerebellums identifiziert (Bredt und Snyder, 1990; Mayer et al., 1990; Schmidt et al., 1991). 1991 wurde die nNOS cDNA erstmals von Bredt et al. kloniert und Nakane et al. (1993) fanden, dass aus humanem Hirn eine cDNA für nNOS ebenfalls im Skelettmuskel hoch exprimiert wird. Die Gruppe des ursprünglichen Entdeckers, Snyder, konnte 1996 eine Splice-Variante, die nNOS $\mu$  als Skelettmuskelform identifizieren. Diese ist 34 Aminosäuren länger und wird unter anderem auch im Herz exprimiert (Silvagno et al., 1996). Neben Enzym in Neuronen ist die nNOS inzwischen in einer Reihe anderer Zellen und Gewebe nachgewiesen worden, wie z.B. im Rückenmark (Dun et al., 1992), in sympathischen Ganglien (Sheng et al., 1993; Dun et al., 1993), in peripheren nitrergen Nerven (Saffrey et al., 1992; Sheng et al., 1992; Hassal et al., 1992), aber auch in Epithelzellen der Lunge, des Uterus oder des Magens (Schmidt et al., 1992), in Macula densa-Zellen der Niere (Schmidt et al., 1992), in Inselzellen des Pankreas (Schmidt et al., 1992), in neutrophilen Granulozyten (Wallerath et al., 1997), in Myozyten des Skelettmuskels (Nakane et al., 1993; Gath et al., 1996) und in Testis (Wang et al., 1997).

Als physiologische Funktionen der nNOS sind Modulation der Neurotransmitter-Freisetzung, synaptische Plastizität, neuronale Entwicklung und Regeneration sowie Regulation der Genexpression bekannt. Durch langanhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung kann es zu einer exzessiven NO-Produktion durch die nNOS kommen und damit zum Umschalten von physiologischen zu einer neurotoxischen Funktion. So spielt NO eine wesentliche Rolle bei neurologischen Erkrankungen wie Parkinson, Huntington, Alzheimer oder amyotropher lateraler Sklerose (Yun et al., 1997; Förstermann et al., 1998; Chabrier et al., 1999).

Die iNOS konnte zuerst in murinen Makrophagen nachgewiesen werden, die nach LPS-Behandlung Nitrit und Nitrat produzierten (Stuehr und Marletta, 1985). Ihre Expression kann in vielen Zelltypen durch Zytokine und andere Stimuli induziert werden. Anfang der 90er Jahre wurden von verschiedensten Arbeitsgruppen Klonierungen und Expressionsstudien publiziert. Lyons et al., Lowenstein et al. sowie Xie et al. (alle 1992) klonierten die cDNA aus murinen Makrophagen, Nunokawa et al. aus glatten Muskelzellen der Ratte (1993) und schließlich Geller et al. aus humanen Hepatozyten sowie Sherman et al. aus einer humanen Tumorzell-Linie (beide 1993). 1993 klonierten Charles et al. eine nNOS-cDNA aus der Ratte in einem Baculovirus-System und exprimierten diese in Insektenzellen. Wie der Name besagt, kann die induzierbare NOS durch Cytokine oder Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden. Ihre Aktivität ist weitgehend (Mensch) oder vollständig (Maus, Ratte)  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig. Das prototypische „high-output“-Enzym findet sich in aktivierten Maus-Makrophagen. Normalerweise ist die iNOS in unstimulierten Zellen nicht oder nur sehr gering exprimiert (Hevel et al., 1991; Stuehr et al., 1991). Mitte der 90er Jahre konnte auch die iNOS in weiteren Zelltypen nachgewiesen werden: in Hepatozyten der Ratte (Wood et al., 1993), in Chondrozyten (Charles et al., 1993), in Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, in Kupfferschen Sternzellen, Alveolarmakrophagen, Mastzellen, Endothelzellen der Niere, der Leber und des Kolons (Bandaletova et al., 1993), in Epithelzellen der Bronchien und des Darms (Kobzik et al., 1993) sowie konstitutiv in Myozyten des Skelettmuskels (Gath et al., 1996).

Durch Blockaden von Enzymen der Atmungskette, des Citratzyklus, der Glykolyse und der DNA-Neusynthese wirken hohe NO-Konzentrationen cytotoxisch. Makrophagen sind mit ihrer Eigenschaft, Bakterien, Pilze etc. durch NO abzutöten, ein essentieller Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr (Kröncke et al., 1998; Harbrecht et al., 1997). 1998 entdeckte Yamasaki et al. erstmals eine wundheilende (also auch nicht zytotoxische) Wirkung von iNOS generiertem NO.



**Tabelle 1.1: Charakteristika von NO-Synthasen.**

	<b>eNOS</b>	<b>nNOS</b>	<b>iNOS</b>
Alternative Namen	NOS III ecNOS	NOS I ncNOS bNOS	NOS II
Subfamilie	konstitutiv	konstitutiv	induzierbar
Genlokus (human)	Chromosom 7 7q35-7q36	Chromosom 12 12q24.2-24.3	Chromosom 17 17q11.2-q12
mRNA (human)	~ 4,8 kb	~ 10 kb	~ 4,5 kb
Länge (human)	1153 AS	1433 AS	1203 AS
Molekulargewicht (human)	131 kDA	161 kDA	133 kDA
Erster gefundener Expressionsort	bovine Aorten-Endothelzellen	Neuronen des Ratten- und Schweinekleinhirns	murine Makrophagen
Weitere Vorkommen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• glatte Muskelzellen</li> <li>• Epithelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epithelzellen</li> <li>• Mesangialzellen</li> <li>• Skelettmuskelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelzellen</li> <li>• Mesangialzellen</li> <li>• glatte Muskelzellen</li> </ul>
Enzymlokalisation	Membran >> Cytosol	Cytosol und Membran	Cytosol >> Membran
K <sub>M</sub> -Werte für Arginin	11,7 µM	2,7 µM	3,6 µM
Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Abhängigkeit	ja	ja	nein
Stimulatoren bzw. Induktoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetylcholin</li> <li>• Bradykinin</li> <li>• Ionomycin</li> <li>• „shear stress“</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glutamat</li> <li>• Lithium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1β</li> <li>• IFN-γ</li> <li>• TNF-α, -β</li> <li>• LPS</li> </ul>
NO-Produktion	wenig pmol (sec)	wenig pmol (sec)	viel nmol (h bis d)
Biologische Wirkung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation</li> <li>• Thrombozytenaggregationshemmung</li> <li>• Proliferationshemmung glatter Muskelzellen</li> <li>• Inhibition der Leukozyten-Adhäsion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotransmission</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cytotoxizität</li> <li>• DNA-Schädigung</li> <li>• Enzymnitrosylierung</li> </ul>

### 1.1.2 Mechanismus der NO-Synthese aus Arginin

NO entsteht aus der Aminosäure L-Arginin durch enzymatische Umwandlung der terminalen Guanidinogruppe durch die NO-Synthase (Palmer und Moncada, 1989; Förstermann et al. 1993). In einem ersten Oxidationsschritt wird aus Arginin und molekularem Sauerstoff zunächst das Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) als enzymgebundenes Intermediat gebildet, das dann in einem zweiten Oxidationsschritt wieder unter Verbrauch von Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgewandelt wird (Abb. 1.1).

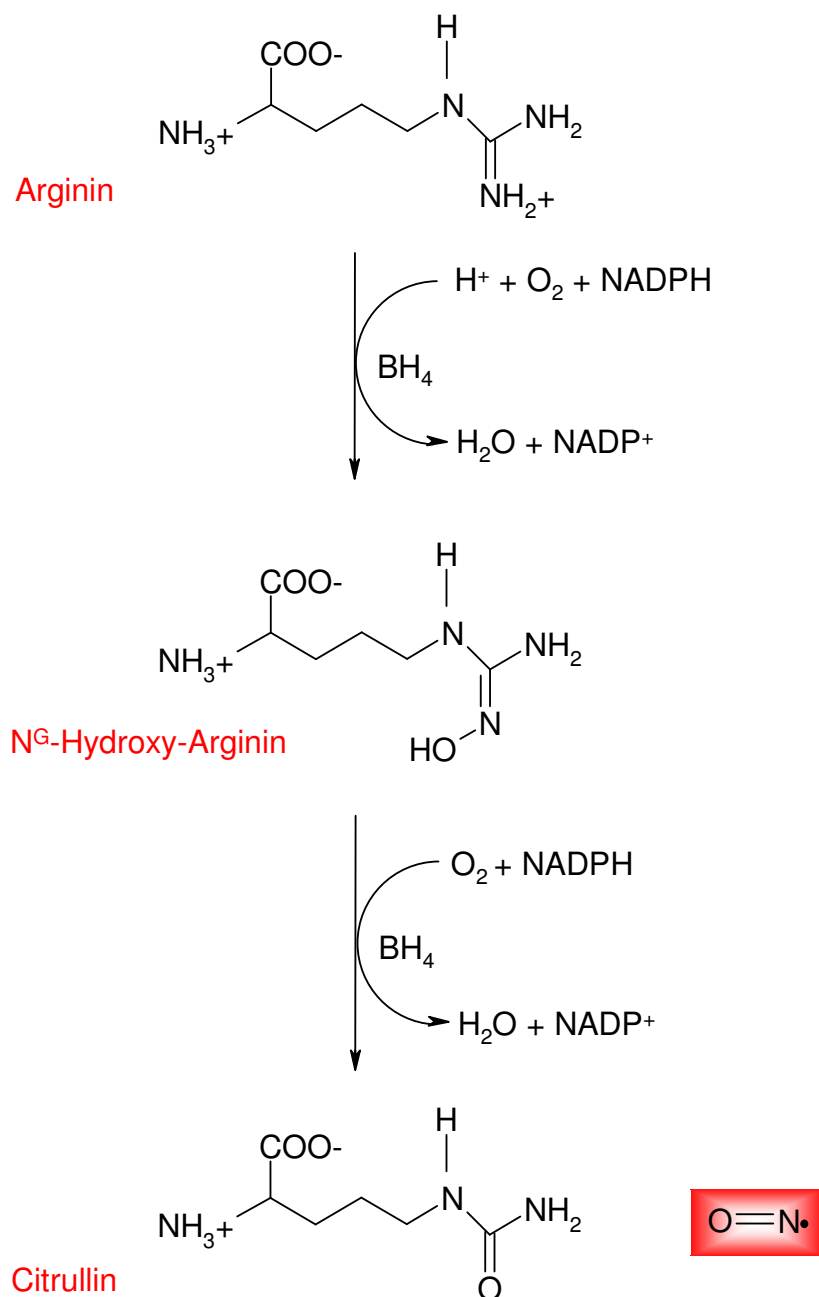


Abbildung 1.1: Reaktionsweg des Arginin-NO-Stoffwechsels.

### 1.1.3 NO-Synthasen können weitere Radikale produzieren

Ein Hinweis, dass bei der Umwandlung von Arginin in Citrullin nicht nur NO, sondern auch andere stickstoffhaltige Radikale entstehen können, liegt darin, dass bei der NO-Synthese NO und Citrullin nicht immer im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 entstehen (Alderton et al., 2001). Bei einem Mangel oder geringer Konzentration an BH<sub>4</sub> oder Arginin kann es zu einer Entkopplung der Reaktion kommen. Dies bedeutet, dass die NO-Synthasen mittels Häm in der Oxygenase Domäne Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) produzieren (Vasquez-Vivar et al., 1998). Das gebildete Superoxid reagiert mit NO zu Peroxinitrit.

### 1.1.4 Inhibitoren der NO-Synthasen

Für die NO-Synthase-Forschung sind NOS-Hemmer unabdingbar. Durch ihren Einsatz kann man z.B. sicherstellen, dass die gemessene Citrullin- oder NO-Produktion tatsächlich durch NO-Synthasen bedingt ist. Die am häufigsten eingesetzten NOS-Hemmer sind die L-Argininanaloga wie N<sup>G</sup>Nitro-L-Arginin (L-NNA), N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin (L-NAA) und N<sup>G</sup>-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME). Diese Substanzen verdrängen kompetitiv Arginin von seiner Bindungsstelle und inhibieren so die Citrullinbildung. Die L-Argininanaloga besitzen keine ausgeprägte (>10 fach) Selektivität für die einzelnen NOS-Isoenzyme. Seit einigen Jahren sind auch selektivere nNOS-Inhibitoren kommerziell erhältlich, zum Beispiel N $\omega$ -propyl-L-Arginin (K<sub>i</sub>=57 nM, 3000 gg iNOS, 150 fach gg eNOS) von Cayman Chemical Company (Michigan, USA), (4S)-N-(4-Amino-5[aminoethyl] aminopentyl)-N-nitroguanidin (K<sub>i</sub>=120 nM, 2500 fach gg eNOS, 320 fach gg iNOS; Hah et al., 2001) und L-N-Nitroarginin-2,4,L-diaminobutyric Amid (K<sub>i</sub>=130 nM, 1500 fach gg eNOS, 192 fach gg iNOS; Huang et al., 1999). Ein selektiver iNOS-Inhibitor ist die Substanz 1400W (N-(3-Aminomethyl) benzylacetamidin) von Glaxo Wellcome (Parmentier et al., 1999), die schnell und reversibel alle drei Isoformen inhibiert (K<sub>i</sub>≈2-50 μM), zusätzlich aber in einer langsamen Phase an die iNOS bindet (5000 fache Selektivität gg eNOS, 200 fach gg nNOS).

## 1.2 Arginin

Die basische Aminosäure Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure, d.h. sie wird zum einen aus der Nahrung aufgenommen und kann zum anderen im gesunden Adulten in ausreichender Menge endogen synthetisiert werden (Rose 1937; Barbul 1986).

### 1.2.1 Arginin-Metabolismus

Nicht jedes Gewebe exprimiert alle Enzyme, die zur De novo-Synthese von Arginin oder zum Katabolismus benötigt werden. Daher ist der Transport von Arginin (und Citrullin) zwischen den einzelnen Organen, Geweben und Zellen notwendig, um die Balance zwischen Arginin-Produktion und Arginin-Verbrauch zu gewährleisten. Intrazellulärer Metabolismus und Membrantransport von Arginin sind wichtige Bestandteile im Körper unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen (Wiesinger 2001).

Die De-Novo-Synthese von Arginin aus Citrullin ist abhängig vom Vorhandensein der Ornithin-Carbamoyltransferase (OCT; EC 2.1.3.3), die zusammen mit der Carbamoylphosphat Synthetase I (CPS I; EC 6.3.4.16) in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist: Ornithin reagiert in der OCT-abhängigen Reaktion mit Carbamoylphosphat zu Citrullin (Abb. 1.2). Die Expression von beiden Enzymen ist in Tieren auf die periportalen Hepatozyten der Leber, den Epithelzellen der Mucosa des Dünndarms und (zu einem geringen Teil) den Colonozyten des Dickdarms beschränkt (Raijman 1974; Knecht et al., 1979; Morris 1992). Daher sind auch lediglich die genannten Gewebe in der Lage, Ornithin zur Citrullin-Synthese zu nutzen. Aufgrund der Expression der Biosynthese-Enzyme in Adulten, findet die wesentliche Ornithin-Produktion aus Glutamat durch die P5C-Synthetase (Abb. 1.2) ausschließlich im Darm statt, der dann das weiter entstandene Citrullin in den Blutkreislauf freisetzt (Windmueller 1982). Das meiste Citrullin wird von der Niere aufgenommen und in den Zellen des proximalen Tubulus zur Arginin-Synthese genutzt. Dieses Arginin wird wiederum in den Blutkreislauf freigesetzt, um andere Organe zu versorgen (Windmueller und Spaeth 1981; Dhanakoti et al., 1992; Rabier und Kamoun 1995).



Im Gegensatz zu den mitochondrialen Enzymen des Harnstoffzyklus OCT und CPS I sind die cytosolische Argininosuccinat-Synthase (ASS; EC 6.3.4.5) und Argininosuccinat-Lyase (ASL; EC 4.3.2.1) nahezu ubiquitär exprimiert (Ratner 1973; Yu et al., 1995). Dies scheint die Rolle dieser so genannten „Recycling“-Enzyme in ihrer Funktion im Citrullin-NO-Zyklus wiederzuspiegeln, da auch die NOS-Isoformen in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion von Citrullin zu Arginin ist die erste Reaktion, die von der ASS katalysiert wird. Dabei wird die Aminosäure Aspartat als Co-Substrat benötigt. Cytosolische Aspartatkonzentrationen und die daraus resultierende Synthese von Argininosuccinat (AS) können durch die Aktivität der mitochondrialen Pyruvatcarboxylase (über Acetyl-CoA) reguliert werden, die Oxalacetat generiert (Rabier und Kamoun 1995).

Die hydrolytische Spaltung von Arginin zu Harnstoff und Ornithin wird von den beiden Isoformen der Arginase (EC 3.5.3.1) katalysiert, deren Expression ein weiteres Beispiel für die Kompartimentierung auf organischer und subzellulärer Ebene darstellt. Die höchste Aktivität der cytosolischen Arginase I findet sich in periportalen Hepatozyten und ermöglicht so der Leber die Beseitigung des Arginin-Stickstoffes in Form von Harnstoff, sodass dort wenig oder keine Netto-Produktion von Arginin zu finden ist (Yu et al., 1995; Gotoh et al., 1997; Miyataka et al., 1998). Die mitochondriale Arginase II, die von einem separaten Gen kodiert wird, ist in der Niere, dem Dünndarm und im Gehirn exprimiert (Gotoh et al., 1997). Eine weitere Funktion der Arginase I im Cytosol liegt in der Bereitstellung von Ornithin für die Polyaminsynthese, eine entsprechende der Arginase II in der Bereitstellung von Ornithin zur Synthese von Prolin und Glutamat in den Mitochondrien (Wu und Morris 1998).

Arginin kann außerdem zu Creatin katabolisiert werden. Die Expression des ersten Enzyms dieser Reaktion, der Arginin:Glycin Amidinotransferase, findet sich hauptsächlich in Niere und Pankreas. Das zweite Enzym hingegen, die Guanidinoacetat N-Methyltransferase wird überwiegend in der Leber und weniger in Niere und Pankreas exprimiert. Auch dieses Expressionsmuster zur Creatin-Biosynthese deutet wiederum auf eine Kooperation zwischen den Organen hin (Wu und Morris, 1998).

Zwei weitere Wege des Arginin-Metabolismus waren in den letzten Jahren im Fokus der Forschung. Lange Zeit wurde geglaubt, die Decarboxylierung von Arginin könnte ausschließlich in Pflanzen und Mikroorganismen stattfinden, jedoch wurden sowohl die Aktivität der mitochondrialen Arginin-Decarboxylase (ADC; EC 4.1.1.19) als auch das Produkt dieser Reaktion, 4-(aminobutyl)Guanidin (=

Agmatin) in Hirn, Leber, Niere, Nebennierendrüse, Makrophagen und im Dünndarm nachgewiesen (Li et al., 1994; Morrissey et al., 1995; Lortie et al., 1996; Sastre et al., 1998), das Enzym war in der mitochondrialen Fraktion der Zellhomogenate zu finden (Morrissey et al., 1995; Li et al., 1995). Im letzten Jahr konnte erstmals ein humaner cDNA Klon identifiziert werden, der nach Expression in COS-7 Zellen ADC-Aktivität zeigte (Zhu et al., 2004).

Die Identifikation von methylierten Arginin-Analoga, im speziellen N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (NMMA) und asymmetrischem N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-Arginin (ADMA) und der ADMA-abbauenden N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-Arginin Dimethylaminohydrolase (DDAH; EC 3.5.3.18) in tierischen Geweben, ebenfalls einschließlich des Gehirns, führte zu Spekulationen über die physiologische Relevanz dieser Arginin-Metabolite (Kimoto et al., 1993; Tojo et al., 1997; Leiper et al., 1999). Methylierte Argininanaloga sind endogene Inhibitoren der NO-Synthasen, ihre möglichen Interaktionen mit der Regulation der NO-Synthese wird im folgenden Kapitel (1.2.2.1) näher beschrieben.

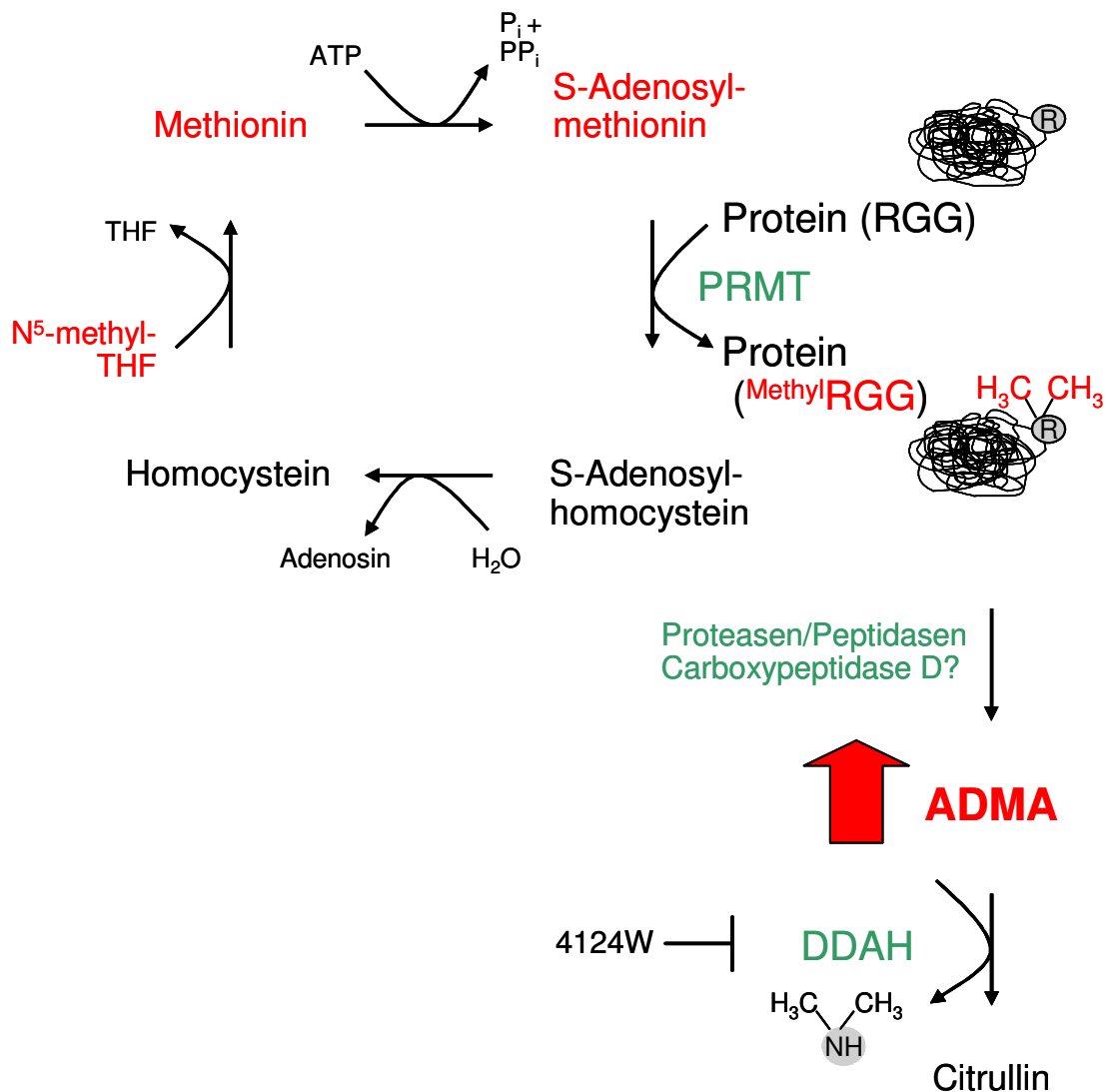
## **1.2.2 Pathophysiologische Bedingungen durch Arginin-Limitierung**

Unter pathophysiologischen Bedingungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen wie z.B. Diabetes, Bluthochdruck oder Hypercholesterinämie, scheint die Verfügbarkeit des Substrates Arginin für die NO-Synthese durch die endotheliale NOS limitierend zu sein (Böger und Bode-Böger, 2001). Dies steht im Widerspruch zu intrazellulären Arginin-Konzentrationen, die ausreichend sind, um die eNOS zu sättigen, ein Phänomen, das Arginin-Paradox genannt wird (Förstermann et al., 1994). Um dieses Phänomen und die zugrunde liegenden pathophysiologischen Veränderungen besser verstehen zu können, ist es daher von Bedeutung, die intrazellulären Arginin-Quellen (insbesondere) der eNOS zu identifizieren, da diese Veränderungen die Ursache für das Paradox sein könnten.

### **1.2.2.1 Der endogene NOS-Inhibitor ADMA**

In den letzten Jahren sind vielfältige Befunde erhoben worden, die zeigen, dass eine vermehrte Bildung oder ein verminderter Abbau des endogenen NOS-Inhibitors ADMA mit endothelialer Dysfunktion einhergehen (Cooke, 2000; Kielstein et al., 2001; Leiper und Vallance, 1999). Die Methylierung von Arginin erfolgt ausschließlich an Argininresten in Proteinen, eine Reaktion die von den so genannten Protein-Arginin-N-Methyltransferasen (PRMT) katalysiert wird. ADMA stammt demnach aus dem Abbau dieser Proteine. In humanen Endothelzellen

wurde gezeigt, dass LDL (low density lipoprotein) die AMDA-Produktion erhöht und dafür die PRMTs verantwortlich sind (Böger et al., 2000).



**Abbildung 1.3: Manipulationsmöglichkeiten für intrazelluläre ADMA-Spiegel.** Eine Erhöhung der endogenen ADMA-Spiegel kann zum einen über eine Steigerung der Methylierung zellulärer Proteine erreicht werden. Substanzen wie Methionin und Homocystein erhöhen erwiesenermaßen die Proteinmethylierung an Argininresten. Die Überexpression von Protein-Arginin-N-Methyl-Transferasen (PRMT) führt ebenso zu einer verstärkten Proteinmethylierung. Des Weiteren führt eine gleichzeitige Hemmung ADMA-abbauender Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen (DDAH) zu einer erhöhten ADMA-Konzentration (Ito et al., 1999; Böger et al., 2000). Eine Verminderung der ADMA-Konzentration könnte einerseits durch Überexpression von DDAH oder Induktion der DDAH-Expression durch all-trans-Retinsäure, andererseits durch eine Hemmung der PRMTs (z.B. mit S-Adenosylhomocystein, Zykloleucin oder Adenosinaldehyd) erreicht werden.



## 1.3 Aminosäure- und Peptidtransport

AS-Transporter können grob in  $\text{Na}^+$ -abhängige und  $\text{Na}^+$ -unabhängige Kategorien unterteilt werden. Erstere nutzen den transmembranen elektrochemischen Natrium-Gradienten, der größtenteils durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten wird, um AS entgegen ihres Konzentrationsgradienten zu transportieren/aufzunehmen. Im Gegensatz dazu erleichtern die zweiten die selektive Bewegung von AS über die Plasmamembran unabhängig von Natriumionen. Die Nomenklatur der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Systeme wird durch Großbuchstaben, die der  $\text{Na}^+$ -unabhängigen durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Einzige Ausnahme ist das Natrium-unabhängige System L, das diese Bezeichnung aus historischen Gründen beibehalten hat (Übersicht: Bode, 2001).

### 1.3.1 Transport-Systeme für Arginin

Die Transportsysteme für basische Aminosäuren (BAS) werden klassischerweise nach zwei Hauptkriterien eingeteilt: zum einen nach ihrer Substratspezifität und zum anderen nach der Abhängigkeit des Transports von Natrium. Es existieren die Natrium-unabhängigen Systeme  $\gamma^+$ ,  $\gamma^+L$ ,  $b^{0,+}$  und  $b^+$  sowie das Natrium-abhängige System  $B^{0,+}$ . Die Bezeichnung „Transport-System“ berücksichtigt, dass ein Komplex von verschiedenen Proteinen und nicht ein einziges Carrier-Protein die spezifische Transportaktivität vermitteln kann. System  $\gamma^+L$  und  $b^{0,+}$  beispielsweise sind heteromere Aminosäure-Transporter (HATs), die jeweils aus einem Glykoprotein und dem eigentlichen Transportprotein zusammengesetzt sind. Die wichtigsten Eigenschaften der Transport-Systeme für BAS werden im Folgenden vorgestellt.

Das erste beschriebene Transportsystem für BAS war das  $\text{Na}^+$ -unabhängige System  $\gamma^+$ , das in den 60er Jahren im Labor von Halvor Christensen entdeckt und charakterisiert wurde (Christensen, 1964; Christensen und Antonioli, 1969). Der Buchstabe  $\gamma$  steht für Lysin, das erste beschriebene Substrat dieses Transportsystems,  $+$  bezeichnet die positive Ladung der Aminosäure-Substrate. Weitere Charakteristika dieses Systems sind seine pH-Unabhängigkeit sowie die Transstimulierbarkeit durch Substrat auf der gegenüberliegenden Membranseite. Die  $K_M$ -Werte für BAS liegen im Bereich ihrer Plasmakonzentration von etwa 0,2 mM (Closs et al., 1997). System  $\gamma^+$ -Aktivität kann mindestens von drei verschiedenen Transportproteinen für BAS vermittelt werden: CAT-1, -2B und -3 (cationiam amino acid transporter). Ein weiteres Transportprotein der CAT-Familie, CAT-2A, eine alternative Splicevariante des CAT-2 Transkripts, zeigt

Transporteigenschaften, für die bisher kein Transport-System definiert worden ist. Die CATs werden nach der *Human Genome Organization (HUGO)* der Genfamilie SLC7 (*solute carrier*) zugeordnet. Die Familie der CAT-Proteine wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.  $\gamma^+$ -Aktivität ist in allen Geweben, mit Ausnahme der Leber zu finden (White, 1985).

Die erste System  $\gamma^+$ L-Transportaktivität konnte von Deves et al. (1992) in der Plasmamembran von humanen Erythrozyten nachgewiesen werden. Dieses Transportsystem ist einzigartig unter den Transportern, da es die Aufnahme von BAS mit einer hohen Affinität  $\text{Na}^+$ -unabhängig vermittelt, jedoch zum Transport von Glutamin und anderen NAS  $\text{Na}^+$  benötigt. Das Substratprofil von  $\gamma^+$ L für NAS entspricht dem des Systems L (Details siehe Glutamin-Transport Kapitel 1.3.2), der Buchstabe L steht für das Modells substrat Leucin. System  $\gamma^+$ L besitzt eine sehr hohe Affinität für NAS und BAS ( $K_M$  für Lys etwa 10  $\mu\text{M}$ ) und vermittelt den Austausch von intrazellulären BAS (Arginin und Lysin) gegen extrazelluläres  $\text{Na}^+$  und NAS wie Glutamin (Kanai et al., 2000; Pfeiffer et al., 1999). System  $\gamma^+$ L zählt zu den Glykoprotein-assoziierten AS-Transportern bestehend aus jeweils dem Glykoprotein 4F2 *heavy chain* (4F2hc) in Kombination mit dem AS-Transporter  $\gamma^+$ LAT1 (SLC7A7) oder  $\gamma^+$ LAT2 (SLC7A6). Die Glykoproteine zählen zur SLC3-Genfamilie, die beiden Transportproteine (auch *light chains* genannt) ebenso wie die CATs zur Familie SLC7.  $\gamma^+$ LAT1 wird in der Niere und im Dünndarm hoch exprimiert,  $\gamma^+$ LAT2 dagegen ist in nicht-epithelialen und epithelialen Geweben verbreitet. Die Expression von System  $\gamma^+$ L konnte außerdem auch in Plazenta und humanen Fibroblasten nachgewiesen werden (Fei et al., 1995; Palacin et al., 1998).

Das System  $b^{0,+}$  transportiert basische und neutrale AS  $\text{Na}^+$ -unabhängig und mit vergleichbaren Affinitäten. Große NAS, die am  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kohlenstoff nicht verzweigt sind werden bevorzugt (Van Winkle et al., 1988). Der Index 0 und + steht wiederum für die Ladung der transportierten AS. Die Transportaktivität wird von dem Carrier-Protein  $b^{0,+}$ AT (SLC7A9) in Kombination mit dem Glykoprotein rBAT (Genfamilie SLC3) vermittelt. Heterologe Expression von rBAT und  $b^{0,+}$ AT induzieren einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen, hochaffinen Transport von Cystein und BAS und einen leicht niedriger affinen Transport von NAS durch einen obligaten Austausch (Chillaron et al., 1996). System  $b^{0,+}$  wurde nach Entdeckung in murinen Blastozysten auch in der Niere und in Trophoblasten der Plazenta nachgewiesen (Van Winkle et al. 1988; Bertran et al., 1992; Furesz et al., 1991) und hat eine vergleichbare Gewebe-Expression wie die basolateralen Transporter  $\gamma^+$ LAT1 und LAT2 (Fernandez et al., 2002).

Eine Ausnahme beim gemeinsamen Transport von BAS zeigen die Systeme  $b_1$  und  $b_2$ , die eine erhöhte Affinität zu Arginin besitzen (besonders  $b_2$ ). Ihre Transportaktivität konnte in Eizellen von Mäusen nachgewiesen werden und wird vermutlich von den gleichen Transportproteinen wie bei System  $y^+$  vermittelt. Es wird postuliert, dass ihre Unterscheidung in Bezug auf die Substratspezifität in der Interaktion mit zellulären Faktoren bestehen könnte sowie durch die Feststellung, dass sie auch in Gegenwart von Natriumionen nicht durch Homoserin oder Leucin hemmbar sind (Van Winkle und Campione, 1990).

System  $B^{0,+}$  vermittelt als einziges System den  $Na^+$ -abhängigen Transport von BAS und NAS (gekennzeichnet durch den Großbuchstaben  $B$ ) und wurde zuerst in Maus-Blastozysten beschrieben (Van Winkle et al., 1985). Die meisten Studien dieses Transporters wurden auf dem Gebiet der murinen Embryogenese durchgeführt (Van Winkle und Campione, 1987; Van Winkle et al., 1990).  $ATB^{0,+}$  (SLC6A14), das Protein, das für die System  $B^{0,+}$ -Transportaktivität verantwortlich ist, zählt zur SLC6-Familie der  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -abhängigen Transporter. Es akzeptiert eine Reihe von Substraten inklusive verzweigten (z.B. 2-Amino[2,2,1] heptan-2-carboxylsäure, BCH) und kleinen NAS (Van Winkle et al., 1985). Auf Basis von elektrophysiologischen Daten wurde der  $K_M$ -Wert von  $ATB^{0,+}$  für Glutamin mit 633  $\mu M$  bestimmt (Sloan und Mager, 1999), was vergleichbar mit SN1 (Kap. 1.3.2) ist. System  $B^{0,+}$ -Aktivität ist in den gleichen Gewebe wie System  $b^{0,+}$  beschrieben worden. Der humane Transporter wird stark in Lunge und Trachea exprimiert (Galiotta et al., 1998)

**Tabelle 1.2: Transportsysteme für BAS**

System	$Na^+$ - Abhängigkeit	Charakteristische Substrate	Erstmals beschrieben	Referenz
$y^+$	-	Lys, Arg, Orn	Reticulozyten Fibroblasten	Christensen und Antonioli, 1969
$b^{0,+}$	-	Lys, Arg, Orn, Leu	Blastozysten	Van Winkle et al., 1988
$y^+L$	- (BAS) + (NAS)	Lys, Arg, Orn Leu, Met, Gln	Erythrozyten	Deves et al., 1992
$B^{0,+}$	+	Lys, Arg, Orn, Ala, Val, BCH	Blastozysten	Van Winkle et al., 1985
$b_1, b_2$	-	Arg	Eizellen (befruchtet u. unbefruchtet)	Van Winkle und Campione, 1990

### 1.3.1.1 Humane CATs

Nach der Entdeckung der ersten murinen CAT-Isoform (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991), die ursprünglich als Rezeptor des murinen Leukämievirus identifiziert wurde (Albritton et al. 1989), konnte Anfang der 90er Jahre ebenfalls der humane CAT-1 kloniert werden (Yoshimoto et al., 1991; Albritton et al., 1992). Es folgten in den späteren Jahren die Identifizierung der weiteren Mitglieder der humanen CAT-Familie 2A und 2B (Closs et al., 1997) sowie des hCAT-3 (Vékony et al., 2001) in unserer Arbeitsgruppe. hCAT2A und -2B sind Splicevarianten, die sich lediglich durch 20 AS, die in einem Abschnitt von 42 AS liegen, unterscheiden. Die Transporteigenschaften von CAT-1, -2B und -3 entsprechen denen des klassischen Systems  $\gamma^+$  mit  $K_M$ -Werten von 0,1 bis 0,4 mM für BAS (Kapitel 1.3.1). Im Gegensatz dazu ist CAT-2A ein niederaffiner Transporter für BAS ( $K_M$  2-5 mM) und relativ insensitive gegenüber trans-Stimulation. Die niedrige Substrataffinität des humanen CAT-2A ist durch 2 AS-Reste innerhalb der 42 unterschiedlichen bedingt: Arg<sup>369</sup> und ein fehlendes Histidin an Position 381 (Habermeier et al., 2003). Anhand von Sequenzhomologien konnte ein verwandtes Protein 1998 von Sperandio et al. identifiziert werden, der als SLC7A4 (hCAT4) bezeichnet wird, dessen Funktion aber noch nicht geklärt werden konnte (Wolf et al., 2002).

hCAT-1 (SLC7A1) ist ubiquitär exprimiert mit Ausnahme der Leber. Seine Expression variiert beträchtlich in verschiedenen Geweben und Zelltypen. CAT-1 kolokalisiert mit Caveolin in Endothelzellen (Übersicht: Mann et al., 2003) und ist in Epithelzellen auf die basolaterale Membran beschränkt (Cariappa et al., 2002; Kizhatil und Albritton, 2002). Neben der Expression in der Plasmamembran wurde CAT-1 außerdem in intrazellulären Vesikeln von Glioblastomzellen gefunden (Wolf et al., 2002). CAT-1 scheint der hauptsächliche System  $\gamma^+$ -Transporter in den meisten Zellen (einschließlich NO-produzierender Zellen) zu sein.

Die beiden Spleiß-Varianten von hCAT-2 (SLC7A2), hCAT-2A und hCAT-2B, zeigen sehr verschiedene Expressionsmuster: hCAT-2A ist überwiegend in der Leber, aber auch im Skelettmuskel, Pankreas, Kardiomyozyten, mikrovasulären Endothelzellen des Herzens und in vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert. hCAT-2B hingegen findet man nach Behandlung mit Zytokinen oder Lipopolysaccharid (LPS) in vielen Zellen. Diese Isoform wird oft zusammen mit iNOS induziert und ist immer mit CAT-1 koexprimiert.

Die Expression von hCAT-3 (SLC7A3) konnte am stärksten im Thymus sowie moderat in Uterus, Testis, Milchdrüse und Gehirn nachgewiesen werden. Eine ursprünglich angenommene Korrelation zwischen der Expression von CAT-3 und nNOS konnte allerdings nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass

hCAT-3 nicht wie in Ratten und Mäusen postuliert ein neuronspezifischer Transporter ist. Transportstudien ergaben, dass hCAT-3 in Bezug auf Substrataffinität und Empfindlichkeit gegenüber Transstimulierung (siehe Tabelle 1.3) am meisten dem induzierbaren hCAT-2B ähnelte (Vékony et al., 2001).

Das als hCAT-4 bezeichnete Protein (SLC7A4) ist nur zu ~40% identisch mit den CAT-Proteinen 1-3. SLC7A4 wird im Gehirn, Testis und Plazenta exprimiert (Sperandeo et al., 1998). Allerdings ist für dieses Protein bisher noch keine überzeugende Transportaktivität gezeigt worden, daher könnte der Name CAT-4 irreführend sein. Studien in unserer Arbeitsgruppe zeigten eine endogene Expression von SLC7A4 in NT2 Teratokarzinom-Zellen, nach Behandlung mit Retinsäure. Doch auch für den endogen exprimierten SLC7A4 konnte keine Transportaktivität für L-Arginin gezeigt werden (Wolf et al., 2002). Die fehlende Transportaktivität von SLC7A4 war nicht auf eine fehlende Expression des Proteins an der Plasmamembran zurückzuführen, da die Lokalisation an der Oberfläche von *Xenopus laevis*-Oozyten und U373MG Glioblastom-Zellen gezeigt werden konnte. Die Expression von SLC7A4 in der Plasmamembran scheint daher nicht ausreichend zu sein, um eine Transportaktivität für AS zu induzieren. SLC7A4 könnte zusätzliche (Protein-)Faktoren benötigen, um funktionell zu sein.

**Tabelle 1.3: Isoformen der Familie kationischer Aminosäure-Transporter (CAT)**

	<b>hCAT-1</b>	<b>hCAT-2A</b>	<b>hCAT-2B</b>	<b>hCAT-3</b>	<b>hCAT-4</b>
Protein	629 AS	657 AS	658 AS	619 AS	636 AS
Molekulargewicht	67 kDa	72 kDa	72 kDa	67 kDa	68 kDa
Identität zu mCAT-Isoform	87,6%	90%	90%	82%	
$K_M$ (mM Arg)	0,11-0,16	3,36-3,90	0,32-0,73	0,45	
Transstimulation	9,8	1,1	1,8	2,0	

Daten der  $K_M$ -Werte für Arginin und Transstimulation der Transporter nach Expression in *Xenopus* Oozyten aus Closs et al., 1997 (hCAT-1, -2A, -2B) und Vékony et al., 2001 (hCAT-3)

Transstimulation: Transportaktivität in 0,25 mM versus 0 trans-Substrat

### 1.3.2 Transportsysteme für Glutamin

Seit den 60er Jahren konnten verschiedenste Glutamin-Transportsysteme anhand ihrer funktionellen Charakteristika wie beispielsweise Substratspezifität, Ionenabhängigkeit, kinetischen und regulatorischen Eigenschaften unterschieden werden. Die ersten bekannten Systeme waren System A (für Alanin-bevorzugendes System) und System L (Leucin-bevorzugtes System) (Oxender und Christensen, 1963). In den folgenden drei Jahrzehnten wurden die Systeme näher charakterisiert. Zu den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glutamin-Transport Systemen zählen die Systeme ASC,  $\text{B}^0$ , N, A,  $\text{B}^{0,+}$  und  $\gamma^+\text{L}$ . Die  $\text{Na}^+$ -unabhängigen sind die Systeme L und  $\text{b}^{0,+}$ . Natürlich transportieren diese Systeme nicht nur Glutamin, sondern auch eine Reihe von anderen AS, daher wurden einige System bereits im Kapitel 1.3.1 „Transportsysteme für BAS“ angesprochen.

$\text{Na}^+$ -abhängige Glutamin-Transport Systeme:

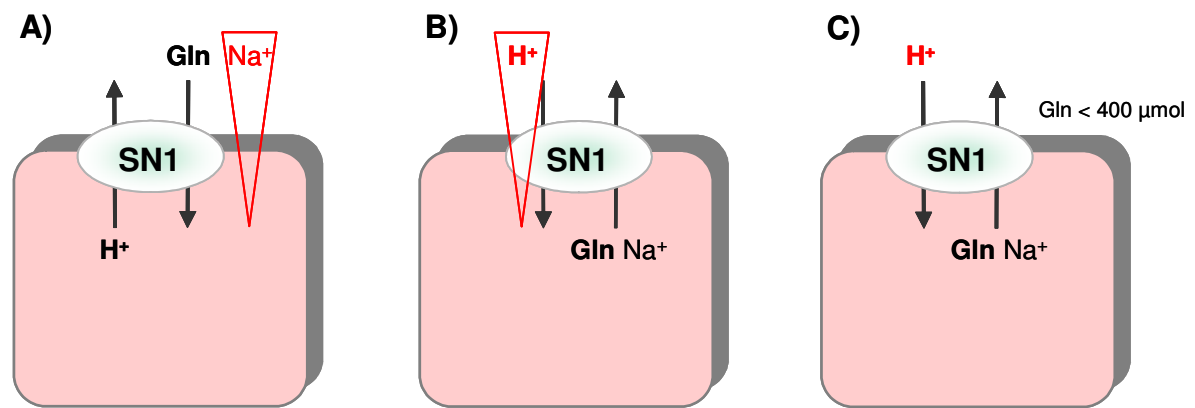
System ASC wurde ursprünglich nach den Substraten Alanin, Serin und Cystein benannt, um es von System A-Aktivität unterscheiden zu können (Christensen et al., 1967). System ASC-Transporter vermitteln den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Austausch von kleinen NAS wie Alanin, Serin, Cystein und Threonin. Sie zählen zur Glutamat/NAS-Transporter-Familie SLC1, die sich aus den 5 hochaffinen Glutamat-Transportern SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A6 und SLC1A7 (System  $\text{X}_{\text{AG}}^-$ ) und den beiden Transportern für NAS SLC1A4 und SLC1A5 (System ASC) zusammensetzt (Arriza et al., 1993; Shafqat et al., 1993). SLC1A4, auch bekannt als ASCT1, wird weitverbreitet exprimiert, im Gehirn überwiegend in Glia-Zellen. Er ist ein obligater Austauscher, der insensitiv gegenüber  $\text{K}^+$ -Ionen ist (Zerangue und Kavanaugh, 1996). SLC1A5, alternativ bezeichnet als ASCT2 und  $\text{ATB}^0$ , transportiert außerdem Glutamin und Asparagin mit hoher Affinität sowie mit niedrigerer Affinität weitere AS wie Leucin, Valin, Glycin oder Methionin (Broer et al., 2000; Utsunomiya-Tate et al., 1996). Der  $K_M$ -Wert für Glutamin schwankt je nach Zelltyp zwischen 90 und 400  $\mu\text{mol}$  und scheint von intrazellulären Substratspiegeln sowie dem elektrischen Transmembranpotential beeinflusst zu werden (Bode et al., 1995; Collins et al., 1998; Souba et al., 1992). Northern Blot Analysen weisen SLC1A5 mRNA in Plazenta, Lunge, Niere, Pankreas, Skelettmuskel und in Colon-Karzinom-Zelllinien nach (Kekuda et al., 1996). Er ist ebenfalls ein obligater Austauscher und wurde wie CAT-1 zunächst als Retrovirus-Rezeptor entdeckt (Rasko et al., 1999).

System B<sup>0</sup> transportiert Na<sup>+</sup>-abhängig alle AS mit neutraler Ladung, für Glycin und Prolin ist seine Transportaktivität jedoch eingeschränkt. System B<sup>0</sup> ist verantwortlich für die Resorption von NAS über die luminale Membran vom proximalen Nieren-Tubulus (Übersicht: Broer et al, 2005). In jüngster Zeit konnte die Gruppe von Stefan Broer zunächst den System B<sup>0</sup>-Transporter B<sup>0</sup>AT (SLC6A19) aus Mäusen klonieren, der außerdem noch in Haut und Darm exprimiert wird. (Broer et al., 2004). Kurz darauf wurde das humane Ortholog gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen kloniert, das die gleichen Transporteigenschaften aufwies. Mutationen im Gen des NAS-Transporters SLC6A19 führen zur Hartnup-Krankheit (Seow et al., 2004; Kleta et al., 2004).

Die erste Beschreibung von System N erfolgte 1980 durch Kilberg und Mitarbeiter in Ratten Hepatozyten. Sie zeigten, dass die Transportaktivität auf die Substrate Glutamin, Histidin und Asparagin beschränkt war. Eine Gemeinsamkeit dieser Substrate ist das Vorkommen eines Stickstoffs in der Seitenkette. Später konnten System N-Aktivitäten ebenfalls in Skelettmuskeln (Hundal et al., 1987) und Neuronen (Tamarappoo et al., 1997) nachgewiesen werden. Zur Unterscheidung von der Isoform der Leber wurden diese mit N<sup>m</sup> und N<sup>b</sup> bezeichnet. System N gehört zur SLC38-Familie der Natrium-gekoppelten Transporter für NAS, zu der auch die System A-Transporter zählen.

Der System N-Transporter hSN1 (SLC38A3) ist ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Protonen-Austauscher, der einen K<sub>M</sub>-Wert für Glutamin von 0,7 bis 1,5 mM aufweist (Bode et al., 1995). Somit zählt der SN1 Transporter zu den niedrig affinen Glutamin-Transportern. Der K<sub>M</sub>-Wert für Asparagin liegt zwischen 9,3-17,5 mM (Pawlik et al., 2001), für Histidin besitzt SN1 die höchste Affinität mit ca. 0,3 mM. Überraschenderweise zeigten Studien in den späteren Jahren, dass SN1 ebenfalls Alanin, allerdings mit geringer Affinität, zu transportieren vermag (Fei et al., 2000; Gu et al., 2000). In eleganten Experimenten konnte die Gruppe um Robert Edwards zeigen, dass die Na<sup>+</sup>-abhängige Glutamin-Aufnahme durch SN1 mit einem Efflux von Protonen verbunden ist und dass durch den SN1 Transporter sowohl ein Einwärts- als auch ein Auswärtstransport – je nach Membranpotential und transmembranen Substrat-Gradienten – möglich ist (Chaudhry et al., 1999). Eine Ansäuerung des extrazellulären Mediums führt ebenfalls zu einem Efflux von Glutamin (Broer et al., 2002; siehe auch Abb. 1.5).

SN2 (SLC38A5) vermittelt ebenfalls einen Na<sup>+</sup>/AS-Kotransport und Gegentransport von Protonen, unterscheidet sich aber von SN1 im Substratprofil. SN2 begünstigt den Transport von Serin zusammen mit den klassischen System N Substraten Glutamin, Histidin und Asparagin (Nakanishi et al., 2001a, 2001b).



**Abbildung 1.5: Mechanismus des Glutamin-Transports durch SN1.** (A) Der Einwärtstransport von Glutamin folgt dem Natriumgradienten und bewirkt gleichzeitig einen Protonenefflux. (B) Bei niedrigem extrazellulärem pH-Wert kommt es zu einem Glutamin-Natrium-Efflux. (C) Extrazelluläre Glutaminkonzentrationen von < 400 μM führen ebenfalls zu einem Natrium-abhängigen Auswärtstransport von Glutamin.

System A (ATA 1/SLC38A1 und ATA2/SLC38A2) konnte durch seine Fähigkeit N-methylierte AS zu transportieren von anderen AT unterschieden werden (Christensen et al., 1965). Der Einsatz von  $\alpha$ -(Methylamino)-isobuttersäure (MeAIB) als Modellsubstrat für System A-Transport brachte enorme Fortschritte in der Charakterisierung. System A Transporter sind weitläufig exprimiert (Hatanaka et al., 2000).

Na<sup>+</sup>-unabhängige Glutamin-Transport Systeme:

System L (LAT1 und LAT2) zählt ebenfalls zur SLC7-Familie. LAT1 (SLC7A5) und LAT2 (SLC7A8) wurden nach Koexpression mit 4F2hc in *Xenopus* Oozyten identifiziert. Ihr Substratspektrum ist relativ weit gefasst und ihre Affinität für verzweigte und aromatische AS liegt im mikromolaren Bereich. LAT2-4F2hc akzeptiert außerdem zusätzlich kleinere AS. Die beiden Transporter dieses Systems sind obligate Austauschpartner (Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998). LAT1 wird in den meisten Tumoren und Tumorzell-Linien exprimiert (Yanagida et al., 2001), LAT2 hingegen in der basolateralen Membran des proximalen Nierentubulus und im Dünndarm (Rossier et al., 1999).

Die Na<sup>+</sup>-abhängigen Systeme  $\gamma^+$ L ( $\gamma^+$ LAT1/SLC7A7 und  $\gamma^+$ LAT2/SLC7A6) und B<sup>0,+</sup>(ATB<sup>0,+</sup>/SLC6A14) sowie das Na<sup>+</sup>-unabhängige System b<sup>0,+</sup> (b<sup>0,+</sup>AT/SLC7A9) wurden bereits im Kapitel 1.3.1 (Transportsysteme für Arginin) beschrieben, sie transportieren ebenfalls Glutamin. Eine Übersicht über die bekannten Glutamin-Transport-Systeme ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.



### 1.3.3 Peptid-Transporter

Mitglieder der SLC15-Familie sind elektrogene Transporter, die dem Protonengradienten folgend, kurzkettige Peptide und Peptido-Mimetika in eine Vielzahl von Zellen transportieren. Die prototypischen Transporter dieser Familie sind die Peptid-Transporter PEPT1 und PEPT2, die eine Aufnahme von Peptiden in Darm- und Nierenepithelzellen vermitteln. Peptide, die aus Proteinabbau stammen, variieren in Molekulargewicht, Ladung und Löslichkeit, abhängig von den vorkommenden AS. Die PEPT-Proteine 1 und 2 verfügen über das Vermögen, sequenzunabhängig alle 400 verschiedenen Dipeptide sowie alle 8000 verschiedenen Tripeptide aus den 20 proteinogenen L- $\alpha$ -AS zu transportieren. PEPT1 kann sowohl in der apikalen Plasmamembran als auch intrazellulär in Lysosomen lokalisiert sein (Zhou et al., 2000), PEPT2 scheint dagegen ein ausschließlich in der Plasmamembran lokalisierter Transporter zu sein (Übersicht: Daniel und Kottra, 2004).

Vor kurzem wurden zwei neue Peptid-Transporter, PHT1 und PHT2 (Peptid-Histidin-Transporter), identifiziert (Yamashita et al., 1997; Sakata et al., 2001). Sie weisen auf AS-Ebene eine 20 bis 25%-ige Identität zu den PEPT-Proteinen auf. Ob PHT1 und PHT2 Proteine ebenfalls das Substratspektrum an Peptiden zu transportieren vermögen wie die PEPTs, ist noch unklar. Im Gegensatz zu den PEPTs akzeptieren sie jedoch freies Histidin als Substrat. Weder PHT1 noch PHT2 wurden bisher auf ihre Antriebskraft, Art des Transports und ihre Substratspezifität hin systematisch untersucht. Jedoch scheint die pH-Abhängigkeit, die für den Transport von Histidin und den Model-Peptiden (z.B. Carnosin) nach Expression von rPHT1 in Oozyten beobachtet wurde, darauf hinzudeuten, dass sie in ähnlicher Weise wie die PEPT-Proteine agieren könnten (Yamashita et al., 1997). PHT1, der ursprünglich aus Rattenhirn kloniert wurde (Yamashita et al., 1997), konnte inzwischen auch aus humaner Plazenta und Caco-2 Zellen kloniert werden (Herrera-Ruiz et al., 2001).

Für PHT1 scheinen mögliche Splice-Varianten zu existieren, die jedoch noch experimentell bezüglich ihrer Funktionalität und Gewebeexpression analysiert werden müssen. Der humane PHT1 scheint außerdem im Vergleich zur PHT1-Expression in Ratte weitläufiger exprimiert zu sein, die Ratten-Expression beschränkt sich auf das Zentrale Nervensystem (ZNS) und die Retina (Botka et al., 2000).

Der 2001 von Sakata et al. identifizierte rPHT2 scheint ein lysosomaler Histidin und Histidyl-Leucin- bzw. Dipeptid-Transporter zu sein. Außer in Lysosomen ist er in Autophagosomen und Vakuolen, nicht aber in der Plasmamembran zu finden.

Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei hPHT1 ausschließlich um einen Plasmamembrantransporter handelt, oder ob er analog zu PEPT1 in anderen Zelltypen auch als lysosomaler Transporter, der für den H<sup>+</sup>-abhängigen Export von Histidin und Dipeptiden aus lysosomaler Degradation ins Cytosol verantwortlich ist, fungieren könnte. Der Umkehrschluss könnte dementsprechend auf den bis heute als lysosomalen Transporter bekannten PHT2 zu ziehen sein. Detailliertere Informationen über die Peptid-Histidin-Transporter liegen bis heute noch nicht vor (Übersicht: Herrera-Ruiz und Knipp, 2002).

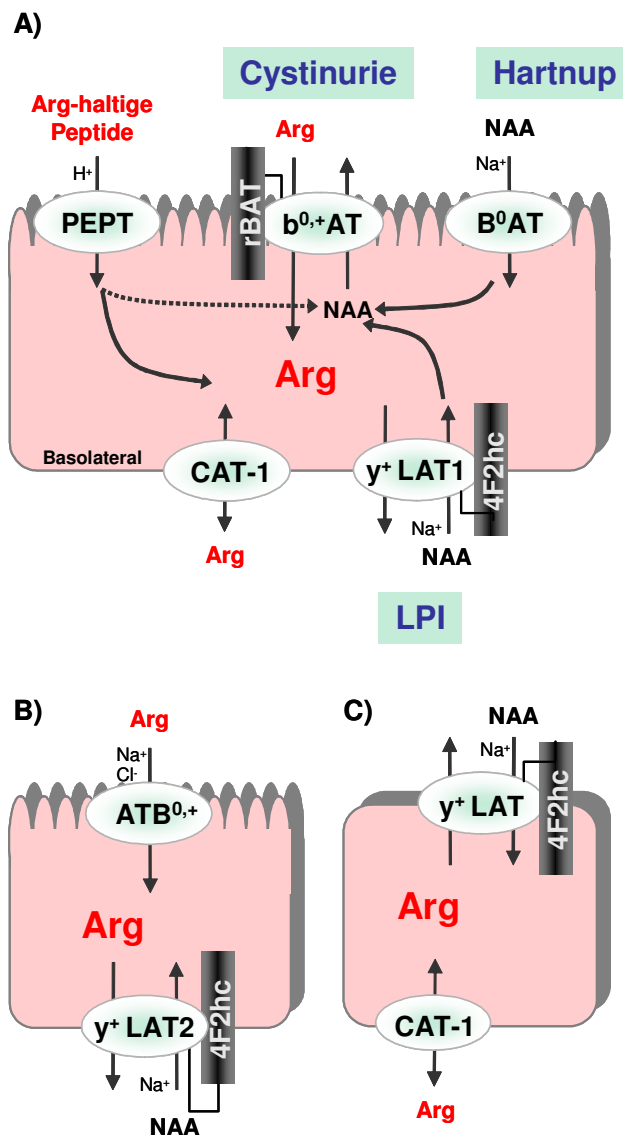
**Tabelle 1.4: SLC15: Die Proton-Oligopeptid Cotransporter-Familie.** Die Säugetier-Peptid-Transporter sind Teil der Superfamilie der protonengekoppelten Oligipeptid-Transporter (POT), die auch als Peptid-Transporter-Familie (PTR) bezeichnet wird (Steiner et al., 1995).

Humaner Genname	Protein	Größe	Substrate	Verteilung/Expression
SLC15A1	PEPT1	708 AS	Di- und Tripeptide	Darm Niere (apikal) lysosomale Membran
SLC15A2	PEPT2	729 AS	Di- und Tripeptide	Niere Lunge, Hirn Brustdrüse, Bronchialepithel
SLC15A3	PHT2	581 AS	Di- und Tripeptide	Lunge, Milz Thymus
SLC15A4	PHT1	577 AS	Histidin Di- und Tripeptide Histidin	(Hirn, Herz, Leukozyten) Skelettmuskel, Niere Hirn, Retina Plazenta

**Tabelle 1.5: Identitäten zwischen Mitgliedern der POT-Familie** (Botka et al., 2000).

	hPEPT1	hPEPT2	hPHT1	hPHT2
hPEPT1		51,3	20,4	26,0
hPEPT2	51,3		22,5	22,9
hPHT1	20,4	22,5		48,4
hPHT2	26,0	23,4	48,4	

Der Transport von Arginin in verschiedenen Zelltypen unter Beeinflussung von NAA und Peptiden durch die vorgestellten Transportsysteme ist in Abb. 1.4 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 1.4: Arginintransport in verschiedenen Zelltypen.** (A) Epithelzelle im Dünndarm oder proximalen Tubulus der Niere: Argininaufnahme wird in der apikalen Membran durch  $rBAT/b^{0,+}AT$  und (in Form von Arginin-haltigen Di- und Tripeptiden)  $PEPT1$  oder  $PEPT2$  vermittelt. Efflux von Arginin erfolgt an der basolateralen Membran über  $4F2hc/y^+LAT1$ .  $CAT-1$ , der ebenfalls in der basolateralen Membran lokalisiert ist, vermittelt einen Austausch von BAS. NAS, die für die Resorption von Arginin an der apikalen Membran notwendig sind, werden von  $PEPT1$  oder 2 und von  $B^0AT$ , sowie an der basolateralen Membran durch  $y^+LAT1$  geliefert. Defekte in  $rBAT/b^{0,+}AT$  und  $y^+LAT1$  sind jeweils für die Krankheiten Cystinurie und LPI (Lysinurie-Protein-Intoleranz) verantwortlich. Fehler in  $B^0AT$  verursachen Hartnup-Krankheit. (B) Dickdarmepithelzelle: Import von Arginin erfolgt über den  $Na^+$ -abhängigen Transporter  $ATB^{0,+}$ , Export über  $4F2hc/y^+LAT2$ . In Lungenepithelzellen wird  $ATB^{0,+}$  mit  $PEPT2$  und  $rBAT/b^{0,+}AT$  in der apikalen Membran koexprimiert,  $4F2hc/y^+LAT1$  und  $4F2hc/y^+LAT2$  sind beide in der basolateralen Membran exprimiert.  $CAT-1$  ist möglicherweise ebenfalls in diesen Zellen exprimiert. (C) Nichtpolarisierte Zelle: In den meisten Zellen wird die Argininaufnahme durch  $CAT-1$  vermittelt,  $4F2hc/y^+LAT1$  oder  $y^+LAT2$  sind für den Efflux verantwortlich.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Substratversorgung von eNOS und nNOS näher zu untersuchen. Es stellte sich die Frage nach der Expression von Transportproteinen für das NOS-Substrat Arginin in den verschiedenen Zelltypen. Da Arginin hauptsächlich über CAT-Proteine (System  $\gamma^+$ ) in die Zellen gelangt, war es möglich, dass es eine Interaktion zwischen bestimmten CAT- und NOS-Isoformen gibt. Zur Beantwortung dieser Frage sollte erstmals eine quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) etabliert werden.

Die in EA.hy926 Endothelzellen entdeckte intrazelluläre Arginin-Quelle, die nicht über basische Aminosäuretransporter mit dem Extrazellulärraum in Verbindung steht (Closs et al., 2000), sollte in primären HUVEC bestätigt und in beiden Zelltypen näher charakterisiert werden. Unsere Hypothese bestand darin, dass es sich bei dieser Quelle entweder um einen membranumgrenzten Arginin-Speicher, um Arginin-bindende Proteine oder um enzymatisch bereit gestelltes Arginin aus Recycling des bei der NO-Synthese gebildeten Citrullins zurück zu Arginin und/oder um Arginin, das aus Proteinabbau freigesetzt wird, handeln könnte. Hierzu wird die NOS-Aktivität im RFL-6 Reporterzell-Assay gemessen, intrazelluläre und extrazelluläre Aminosäurekonzentrationen in HPLC-Analysen bestimmt, die Arginin-Regeneration aus radioaktiv markiertem Citrullin gemessen sowie Inhibitoren des Proteinabbaus eingesetzt.

Es stellte sich darüber hinaus die Frage, ob diese nicht-austauschbare Arginin-Quelle ausschließlich Endothelzellen vorbehalten ist. Zur Beantwortung dieser Frage sollten Experimente an nicht-endothelialen Zellen durchgeführt werden, die mit der eNOS stabil transfiziert worden waren.

Aufbauend auf Resultaten zur Substratversorgung der eNOS sollte schließlich die NO-Produktion von nNOS exprimierenden Zellen untersucht werden. Zunächst musste eine Zelllinie mit ausreichend hoher NOS-Aktivität gefunden werden. Mit dieser konnte die Frage beantwortet werden, ob auch die neuronale NOS-Isoform neben einer über System  $\gamma^+$  austauschbaren Arginin-Quelle Zugang zu einer zweiten intrazellulären hat und inwiefern sich diese möglicherweise von der in Endothelzellen unterscheidet?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

Art des Geräts	Gerätebezeichnung	Hersteller
<u>Anlagen zur Elektrophorese:</u>		
Gleichstromquellen	Power Pac 300	Bio-Rad
<u>Meßgeräte:</u>		
HPLC	L-6200A	Merck Hitachi
HPLC Autosampler	L-7250	Merck Hitachi
HPLC Fluoreszenz Monitor	RF-530	Shimadzu
HPLC-Säulen	C18, 4 µm 3,9x300 mm	Waters
NO-Analyzer	NOA 270B mit automatischem Probengeber Promis	Sievers Spark
Mikrotiterplatten-Photometer	Fluostar Optima	BMG
Molecular Imager	Personal Molecular Imager FX mit Screen Eraser-K	Bio-Rad
PCR-Gerät	iCycler	Bio-Rad
Photometer	GeneQuant RNA/DNA Calculator	Pharmacia/ Amersham
Szintillationszähler	Tri-Carb 4000 Series Cobra Quantum	Packard/ Perkin Elmer

Sonstige Laborgeräte:

Begasungsbrutschränke	Function Line	Heraeus
Binokular	GZ6	Leica
Digitalkamera	DXM 1200	Nikon
Heizplatte mit Magnetrührer	Ikamag RCT	Janke & Kunkel
Laborwaage	Mettler K7	Mettler, Zürich
	Analytic	Sartorius
Mikrobiologische Brutschränke	WTC binder	Labotec
Multipipette	Multipette plus	Eppendorf
Pipetten, verstellbare	Gilson	Abimed
	P2, P10, P20, P100, P1000	
Pipettierhilfe	Pipetus	Merck
	Micropipetter	Merck
pH-Meter	CG 809	Schott
Präzisions-Küvette	Quarzglas Suprasil	Hellma
Sterile Werkbank	Biohazard	BDK
Ultraschall-Homogenisator	Transsoncic T570	Elma
UV-Sterilisationskammer	GS-Gene-Linker	Bio-Rad
UV-Tisch	Mini-Transilluminator	Bio-Rad
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus	Millipore Waters
Wasserbad	Certomat WR	B.Braun
Zählkammer für Zellen	Neubauer-Zählkammer	Labotec

Zentrifugen:

Hochgeschwindigkeitszentrifugen	J2-MC mit Rotoren	
	JA 13.1, JA 14	Beckman
	Avanti J-30I mit Rotoren	
	JA 25.50 und JLA 16.250	Beckmann
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Tischzentrifugen	Biofuge 13	Heraeus
	Centrifuge 5417C	Eppendorf
Vakuumpzentrifuge	Speed Vac SC-110	
	mit Kühlfalle Vapor Trap	
	RVT 100	Savant

### 2.1.2 Plastikwaren

Alle Plastikwaren, die in der Zellkultur Verwendung fanden, wurden (falls nicht anders angegeben) steril von Greiner, BD Falcon oder Sarstedt bezogen.

Einweg-Auslaufpipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml
Filter-Spitzen	20 µl, 200 µl, 1000 µl ART 10F 0,5-10 µl (MBP)
Kryoröhrchen	1,5 ml (Nalgene)
Makroplatten, 6-Loch	Kulturfläche je Loch: 9,6 cm <sup>2</sup>
Mikroplatten, 96-Loch	für Proteinbestimmung für real-Time RT-PCR (Eurogentec)
Plastikpipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml
RIA-Meßröhrchen + Stopfen	5 ml, 75×12 mm Ø
Zellkulturflaschen, Filter Top	Kulturfläche/Volumen (cm <sup>2</sup> /ml): 75/250 und 25/50
Zellkultur-Petrischalen	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm <sup>2</sup> ): 14,5/145, 9,4/58 und 6,0/21
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml Spitzboden, 14 ml Rundboden

### 2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Medien (mit L-Glutamin) und Chemikalien für die Zellkultur wurden von den angegebenen Firmen in Zellkulturqualität bezogen.

#### Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA
DMEM/Nutrient Mix F-12 (Ham) 1:1	PAA
Endothelial Growth Medium	Promocell
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	PAA
Medium 199	PAA
Minimal Essential Medium Eagle with Earl's Salts	PAA
Nutrient Mix F-12 (Ham)	PAA

Zellkultur-Zusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Fötale Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Biochrom
Humanes Fibronectin 1 mg/ml	Biochrom
Humanes Interferon-gamma (IFN-gamma)	Strathmann Biotec AG Hamburg
Humanes Interleukin-1 beta (IL-1 beta)	Strathmann Biotec AG Hamburg
Humaner Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF-alpha)	Strathmann Biotec AG Hamburg
L-Glutamin, 100 fach konzentriert	Sigma
Penicillin/Streptomycin, 100 fach konzentriert	Gibco
Steriles PBS	PAA
Trypsin/EDTA-Lösung, 10 fach konzentriert	Gibco

**2.1.4 Weitere Verbrauchsmaterialien**

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (20x20 cm)	VWR
Einmal-Kapillarpipette mit Ringmarke (Hirschmann Laborgeräte)	VWR
Kodak Storage Phosphor Screen	Bio-Rad
Kodak Exposure Cassette	Bio-Rad
Parafilm <sup>®</sup> "M", Laboratory Film, American National Can <sup>™</sup>	Merck
Pasteur-Kapillarpipetten "Volac"	John Poulten Ltd.
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell

**2.1.5 Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck, Roth, oder Sigma in p.a.-Qualität bezogen. Chemikalien für HPLC-Analysen wurden entsprechend in HPLC-Qualität bezogen.

Spezielle Chemikalien:

Acetonitril	Baker
Agarose	Boehringer Mannheim
Ammoniumacetat	Roth
2-Amino-2-Norbornane-carboxylic Acid (BCH)	Sigma
L-Aminosäuren	Sigma/Fluka



Asymmertisches Dimethyl Arginin (ADMA)	Sigma
Bradfordreagenz, 40%-ige Lösung	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Bovine Serum Albumin, Fraction V, purity 98%	ICN Biomedicals Inc.
Calciumionophor A23187	Sigma
Chloroform	Riedel-de Hään
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) (Tris gesättigt)	Roth
N <sup>6</sup> ,2'-o-Dibutyryladenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate (Dibutyryl cyclic AMP)	Sigma
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethylendioxy-bis-(ethylenitril)-tetraacetat (EGTA)	Sigma
Gamma-Globulin	Sigma
Glucose	Roth
HPLC-Wasser	Fisher Scientific
3-Isobutyl-1-methylxanthin, IBMX	Serva
Isopropanol	Apotheke Klinikum
3-Morpholino-Sydnominin, SIN-1	Sigma
G418 Sulfat	Calbiochem
Kupfer (II)-sulfat-Pentahydrat Lösung 4% (w/v)	Sigma
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Baker
Magnesiumchlorid	Qiagen
Natriumacetat	Roth
di-Natriumtetraborat	Merck
N-CBZ-Leu-Leu-Leu-Al (MG132)	Sigma
L-N <sup>G</sup> -Nitro-Arginine-Methylester (NAME)	Sigma
NTP's und dNTP's	Amersham
Orthophthaldialdehyd (OPA)	Merck
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
RNAse-Inhibitor 40 U/μl	Amersham
Szintillationflüssigkeit Quicksafe A	Zinnser Analytic
Superoxid-Dismutase	Roche
Triethylamin	Fluka
Tris	Roth

Radiochemikalien:

Die verwendeten Radionukleotide wurden von der Firma Biotrend bezogen.

$^{125}\text{I}$ -cGMP	Spezifische Aktivität (S.A.): 81,4 Tbq/mmol $\gamma$ -Strahler, Halbwertszeit: 60 Tage
L-[ureido- $^{14}\text{C}$ ]-Citrullin	S. A.: 50-60 mCi/mmol 1,85-2,22 GBq/mmol $\beta$ -Strahler, Halbwertszeit: 5730 Jahre
L-[ureido- $^{14}\text{C}$ ]-Arginin	S. A.: 200-300 mCi/mmol 7,74-11,1 GBq/mmol $\beta$ -Strahler, Halbwertszeit: 5730 Jahre
L-[5- $^{14}\text{C}$ ]-Ornithin	S. A.: 50-60 mCi/mmol 1,85-2,22 GBq/mmol $\beta$ -Strahler, Halbwertszeit: 5730 Jahre

$^{125}\text{I}$ -cGMP wurde im RFL-6-Assay beim RIA benutzt,  $^{14}\text{C}$ -Citrullin,  $^{14}\text{C}$ -Ornithin und  $^{14}\text{C}$ -Arginin zur DC-Analyse von Citrullin zu Arginin.

**2.1.6 Enzyme und Kits**

*BamH I* Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz G↓GATCC, (Amersham)  
DNase I, RNase frei, 10 U/ $\mu\text{l}$ , Doppelstrang-spezifische Endonuklease, (Ambion)  
*Eco RI*, Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz: G↓AATTC, (Amersham)  
Nitrat-Reduktase, (Boehringer Mannheim)  
*Sal I* Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz G↓TCGAC, (Amersham)  
SOD, Superoxiddismutase, (Serva)

mMessage mMachine SP6-Kit für <i>in vitro</i> Transkription	Ambion
Plasmid Mini Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG AG Biotech, Ebersberg oder Operon (Qiagen), Hilden bezogen, TaqMan Sonden von TibMolBiol, Berlin oder Operon (Qiagen), Hilden. Die Namen setzen sich zusammen aus der Abkürzung der mRNA(z.B. HC1: humaner CAT-1), der Position in der codierenden Sequenz sowie der Bezeichnungen „ss“ für sense-strand und „as“ für antisense-strand Orientierung. In Ausnahmefällen stehen die Bezeichnungen „for“ bzw. „F“ für die sense- und „rev“ bzw. „R“ für die antisense-Orientierung.

#### 2.1.7.1 Oligonukleotide

NAME	SEQUENZ (5'-3')	LÄNGE (BP)
<b>GAPDH.502ss</b>	AGCCTCAAGATCATCAGCAATG	22
<b>GAPDH.588as</b>	CACGATACCAAAGTTGTCATGGA	23
<b>hASS.1019ss</b>	TGAAATTTGCTGAGCTGGTG	20
<b>hASS.1272as</b>	CAGCCTGAGGGAATTGATGT	20
<b>hASL.266ss</b>	GCCTAGACAAGGTGGCTGAG	20
<b>hASL.506as</b>	CGATCCACCATGGTCCTAAT	20
<b>hb0,+AT.1158ss</b>	TGGCCTGACGATTCTAGGACTC	22
<b>hb0,+AT.1415as</b>	TGCATGGTAATCGGCTTTGAG	21
<b>HC1.330ss</b>	CTTCATCACCGGCTGGAACT	20
<b>HC1.429as</b>	GGGTCTGCCTATCAGCTCGT	20
<b>HC2AB.1032ss</b>	TTCTCTCTGCGCCTTGTCAA	20
<b>HC2A.1125as</b>	TCTAAACAGTAAGCCATCCCGG	22
<b>HC2B.1112as</b>	CCATCCTCCGCCATAGCATA	20
<b>HC3ss1099</b>	GGCCTCCTGTTCCGTGTA CTT	21
<b>HC3as1228</b>	TGAGGTCCACAAGATCAGTGAGTT	24
<b>heNOS_for_D</b>	GTGGCTGTCTGCATGGACCT	20
<b>heNOS_rev_D</b>	CCACGATGGTGACTTTGGCT	20
<b>hGAPDHss</b>	CCACATCGCTCAGACACCAT	20
<b>hGAPDHas</b>	TACATGACAAGGTGCGGCTC	20
<b>hiNOS_for_D</b>	TGCAGACACGTGCGT TACTCC	21
<b>hiNOS_rev_D</b>	GGTAGCCAGCATAGCGGATG	20
<b>hnNOS F</b>	GGTGGAGATCAATATCGCGGTT	22
<b>hnNOS R</b>	CCGGCAGCGG TACTCATTCT	20
<b>hPepT1.296fwd</b>	AGTTCAAGACCATTGTGTCGCTC	23

<b>hPepT1.389rev</b>	TGGTTGTGGTCTGTGAGGTCA	21
<b>hPepT2.2044fwd</b>	GGTACAGTGGGCCGAATTCA	20
<b>hPepT2.2130rev</b>	GGAACATAGTAGTACCATGATGG	25
<b>hPHT1.1444ss</b>	GATCAGCGAGATCTTTGCAAGTATC	25
<b>hPHT1.1525as</b>	CATTATGGCACTCTGCATGGAC	22
<b>hPHT1.1504ss</b>	GTCCATGCAGAGTGCCATAATG	22
<b>hPHT1.1745as</b>	GGTCTCGATGATGGTCATATTTCA	24
<b>hPHT2.887ss</b>	CGTTTATTCAGCAGAACATCAGCTT	25
<b>hPHT2.1221as</b>	GACCATCCAGTAGGGCACCA	20
<b>hPHT2.1299ss</b>	CAACATCTCTGTGGACCTGAG	21
<b>hPHT2.1379as</b>	ACCACAACATTGGCCAGGAG	20
<b>hSN1.87ss</b>	GGTGTGAGACCAGTGCTCCT	20
<b>hSN1.1682as</b>	CAGGGCTGCTAGGGTGAGTA	20
<b>hSN1.625ss</b>	GCTGCCACTTGTACATACAGACC	22
<b>hSN1.760as</b>	GTAGCCAAGCTGCCGCAT	18
<b>hSN1.628ss</b>	GCCACTTGTACATACAGACCTTCC	23
<b>hSN1.806as</b>	GGAAGAACACCATGCAGCTAA	21
<b>hSN1.753as</b>	AGCTGCCGCATCAGTGC	17
<b>hSN1.1347ss</b>	TGCTTATTGCCGTTGGCCT	19
<b>hSN1.1642as</b>	ACCCTAGTGGTTTCCTCCATGC	20
<b>hSN1.1555ss</b>	TGGCTTCTTGCTGATGACC	19
<b>hSN1.1851as</b>	ACAGCTCCAGAGCCTAGCAG	22
<b>hSN2.1298ss</b>	TGGTTATCGGCACCTTCC	18
<b>hSN2.1551as</b>	CACGAGAGCTTCACTCTCCATT	22
<b>hSN2.1346ss</b>	TGAAGGGAAACCTCCTCATC	20
<b>hSN2.1635as</b>	AATGGGCACTGTGTAGGACA	20
<b>hSN2.1965ss</b>	ACGACATGTGGCCATAGCTCT	21
<b>hSN2.2231as</b>	GCCCAGTTGGCAAACATAAAG	21
<b>hy+LAT1.1055ss</b>	ATGTTGAGCGGTTACACCAG	21
<b>hy+LAT1.1312as</b>	TGTAAAGTGGAACAGCCACCAG	22
<b>hy+LAT2.1054ss</b>	AGTGTGTTGGCCATGATCCAC	21
<b>hy+LAT2.1305as</b>	GGCCCAGAACAGCAAGTAGATG	22
<b>hy+LAT1.982ss</b>	ATTGTGGCTGCTTCAAGGC	19
<b>hy+LAT1.1073as</b>	GGTGTGAACCGCTCAACATG	20
<b>hy+LAT2.1431ss</b>	TGACTTCATTGAGCTGCTAACCC	23
<b>hy+LAT2.1530as</b>	GTCCTCATTAGCCTCCTCTGTCC	23
<b>RC1.325ss</b>	TCACTGGCTGGAACCTGATTC	21
<b>RC1.438as</b>	CTCTCCGATGGGTTTGCCTA	20

<b>RC2AB.1024ss</b>	GCCGCAGGCTCCCTCT	16
<b>RC2A.1125as</b>	TCTAAACAGTAAGCCATCCCGG	22
<b>rGAPDH.418ss</b>	AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	23
<b>rGAPDH.526as</b>	CTGTGGTCATGAGCCCTTCC	20
<b>riNOS.745ss</b>	GATGGGAAGCATGACTTCCG	20
<b>riNOS.835as</b>	CAGGATCCCCTCTGATGGTG	20
<b>rnNOS.1929ss</b>	TGACAAGGTGACCATCGTTGAC	21
<b>rnNOS.2054as</b>	CCCGACATGGGAGGCAC	17

### 2.1.7.2 TaqMan Sonden

NAME	SEQUENZ (5'-3')	LÄNGE (BP)	AMPLIKON (BP) dazugehörige Oligonukleotide
<b>HC1.Taq1</b>	6FAM- AATCCTCTCCTACATCATCGGT ACTTCAAGCGT[TAMRA]	33	100 HC1.330ss HC1.429as
<b>HC2A.Taq1</b>	6FAM- TCTGGGCTCTATGTTTCCTTTA CCCCGAA[TAMRA]	29	94 HC2AB.1032ss HC2A.1125as
<b>HC2B.Taq1</b>	6FAM- TGGATCCATTTTCCCAATGCCT CGT[TAMRA]	25	81 HC2AB.1032ss HC2B.1112as
<b>HC-3.Taq1</b>	6FAM- ATCCACACCGGCACACGCACC [TAMRA]	21	130 HC3ss1099 HC3as1228
<b>heNOS_probe_D</b>	6FAM- AGTGGAATCAACGTGGCCGT GCTGC[TAMRA]	26	121 heNOS_for_D heNOS_rev_D
<b>hGAPDHTaq1</b>	6FAM- CTGCACCACCAACTGCTTAGC ACCC [TAMRA]	25	87 GAPDH.502ss GAPDH.588as
<b>GATM2</b>	5TAMRA- CTGCACCACCAACTGCTTAGC ACCC[JOE]	25	87 GAPDH.502ss GAPDH.588as
<b>hy<sup>+</sup>LAT1.Taq1</b>	6FAM- CCATCTCCCTGATGCCATCTG CATG[TAMRA]	25	92 hy <sup>+</sup> LAT1.982ss hy <sup>+</sup> LAT1.1073as

<b>hy<sup>+</sup>LAT2.Taq1</b>	6FAM- TGAGCCAGAAGATGTGTGTGG TCGTGTAC[TAMRA]	29	100 hy <sup>+</sup> LAT2.1431ss hy <sup>+</sup> LAT2.1530as
<b>hiNOS_probe_D</b>	6FAM- TGGCAAGCACGACTTCCGGGT G[TAMRA]	22	328 hiNOS_for_D hiNOS_rev_D
<b>hnNOS TM</b>	6FAM- TTGTTGACCATCACTCCGCCA CCGA[TAMRA]	25	118 hnNOS F hnNOS R
<b>hPepT1.329taq1</b>	6FAM- ACACAATTGGACAAGCAGTCA CCTCAGTAAGC[TAMRA]	32	94 PepT1.296fwd PepT2.389rev
<b>hPepT2.2067taq1</b>	6FAM- TGTTTTCTGCCTCCTGCTGGT GATC[TAMRA]	26	87 PepT2.2044fwd PepT2.2130rev
<b>hPHT1.Taq1</b>	6FAM- AGGCCTGGAATTTGCATACTC AGCTGC[TAMRA]	27	82 hPHT1.1444ss hPHT1.1525as
<b>hPHT2.Taq1</b>	6FAM- AGGGCAGCAGCTACACGATCC CCG[TAMRA]	24	81 hPHT2.1299ss hPHT2.1379as
<b>hSN1.Taq1</b>	6FAM- CCTCGGACTGGTACATGAACG GGAAC[TAMRA]	26	136 hSN1.625ss hSN1.760as
<b>RC1.Taq1</b>	6FAM- TCCTACATCATCGGTACATCCA GCGTGGT[TAMRA]	29	114 RC1.325ss RC1.438as
<b>RC2A.Taq1</b>	6FAM- TTACCCCGCATTCTGTTTGCCA TGGT[TAMRA]	26	102 RC2AB.1024ss RC2A.1125as
<b>rGAPD.Taq1</b>	6FAM- CATCCTGCACCACCAACTGCT TAGCC[TAMRA]	26	109 rGAPDH.418ss rGAPDH.526as
<b>riNOS.Taq1</b>	6FAM- CCAGCTCATCCGGTACGCTGG CTA[TAMRA]	24	91 riNOS.745ss riNOS.835as
<b>rnNOS.Taq1</b>	6FAM- CTGCCACGGAGTCCTTCATCA AACACAT[TAMRA]	28	126 rnNOS.1929ss rnNOS.2054as

### 2.1.8 Plasmide

Der Klonierungsvektor pSP64T (Krieg und Melton, 1984) enthält einen SP6-Promotor vor der *Multiple-Cloning-Site* (MCS), so dass die Möglichkeit besteht, die klonierten Sequenzen in mRNA zu transkribieren. Zwischen SP6-Promotor und einer vor der MCS liegenden *Bgl* II-Erkennungssequenz befindet sich die 5'-untranslationierte Region der  $\beta$ -Globin-Sequenz, nach der *Bgl* II Site die  $\beta$ -Globin 3'-untranslationierte Region. Diese Sequenzen tragen zur verbesserten Stabilität der *in vitro* transkribierten cRNA in Oozyten bei.

### 2.1.9 Software

GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software inc., San Diego, USA)

HPLC D-7000 HSM (Merck)

iCycler Software v2.3 (BioRad)

Multi Analyst v1.1 (BioRad)

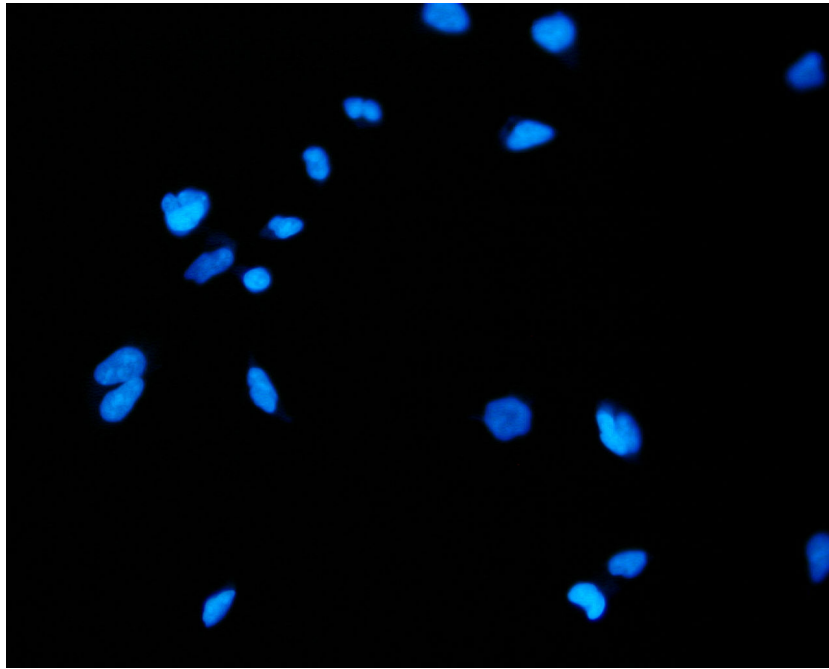
Primer Express<sup>®</sup> Software v1.5 (Applied Biosystems)

## 2.2 Methoden der Zellkultur

### 2.2.1 Allgemeine Bedingungen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen, dabei wurden die Zellen einmal pro Woche passagiert (Kapitel 2.2.2) und zusätzlich einmal (bzw. zweimal bei sehr stoffwechselaktiven Zellen wie A673, TGW-nu-I und NB-OK-I) pro Woche das Medium gewechselt. Die konfluenten Zellen konnten für die entsprechenden Experimente in Ø 9,4 cm Schalen (HPLC-Analyse, DC-Analyse, RNA-Isolation), bzw. in 6-Loch-Makroplatten (NO-Bestimmung, RNA-Isolation) ausgesät werden. Nach jeweils 7-8 Passagen wurden die Kulturflaschen gewechselt, die Zellen nach 15-18 Passagen verworfen und zur Weiterarbeit frische Zellen aufgetaut. Eine Sonderstellung innerhalb der Zellkultur nahmen die HUVECs ein, die auf Fibronectin oder Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen wachsen mussten und nur bis zur 3. Passage verwendet werden konnten. A673, DLD-1, EA.hy926, ECV 304, HaCaT und NB-OK-I wurden im Brutschrank bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert, HEK-GC, HUVEC, NT-2, RFL-6, SK-N-MC und TGW-nu-I bei 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Inaktivierung von Komplement-Komponenten wurde das dem Medium zugesetzte FBS für alle Zelllinien zuvor 30 Minuten im Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Alle Zellen wurden regelmäßig mit 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/0799050b.pdf>) auf eine Mycoplasmen-Infektion getestet. Hierzu mussten die Zellen zunächst mindestens 4 Passagen ohne Antibiotika kultiviert werden, bevor sie auf einer 5 cm Zellkulturschale ausgesät wurden. Nach einer Dauer von 2-3 Tagen wurde das Medium abgesaugt und die nicht-konfluenten Zellen 1 min in Methanol:Eisessig (3:1, -20 °C) inkubiert und anschließend getrocknet. 3 µl Dapi (1 mg/ml in Methanol) wurde in 1 ml PBS verdünnt und auf den Zellen 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach einer Spülung mit H<sub>2</sub>O konnten die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.





**Abbildung 2.1: Keine Mycoplasmen-Kontamination in HEK-GC-Zellen.** Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an DNA und bildet stark-fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. DAPI hat in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 340$  nm und ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 488$  nm. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Bei einer Mycoplasmen-Kontamination von Zellkulturen findet man einzelne fluoreszierende Punkte im Zytoplasma und manchmal auch im interzellulären Raum. Eine nicht-kontaminierte Zellkultur zeigt nur nukleäre Fluoreszenz gegen einen dunklen zytoplasmatischen Hintergrund.

### 2.2.2 Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum kultivieren zu können, müssen diese in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Dies ist erforderlich, da Zellen in der Regel eine Wachstumshemmung erfahren oder absterben, sobald sie konfluent sind.

Die zu passagierenden Zellen wurden zunächst mit 10 ml PBS gewaschen, da Reste von FBS die Wirkung von Trypsin inhibieren. Bei RFL-6 Zellen musste dieser Schritt, bedingt durch 15 % FBS im Kulturmedium, wiederholt werden. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,25% Trypsin) benetzt und die Lösung wieder abgesaugt. Nach einer Inkubation bei 37°C konnten die Zellen durch seitliches Klopfen an der Flasche vom Boden gelöst und in frischem Medium resuspendiert werden. Die Dauer der Inkubation richtete sich dabei nach der Adhärenz sowie der Empfindlichkeit der unterschiedlichen

Zelltypen, A673-Zellen durften beispielsweise nur sehr kurze Zeit inkubiert werden, RFL-6-Zellen hingegen mehrere Minuten. Ein Aliquot der Suspension wurde dann mit frischem Medium versetzt und zur Weiterkultivierung verwendet. Zur langfristigen Aufbewahrung von Zellen mussten diese eingefroren werden. Hierzu nahm man die Zellen nach dem Ablösen in 10 ml Medium auf, resuspendierte und pelletierte sie bei 900rpm für 10 min. Die Zellen wurden in einem kleinen Volumen, bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO, wieder aufgenommen und in verschraubbare Kryoröhrchen überführt. In einer dickwandigen Styroporbox kühlten die Zellen über Nacht bei -70°C langsam ab und wurden anschließend unter flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Zum Auftauen wurde das bei -196°C gelagerte Aliquot schnell auf 37°C erwärmt und die Zellen in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 900 rpm wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen in eine Kulturflasche mit 10 ml Medium überführt.

## **2.2.3 Kulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien**

### **2.2.3.1 A673**

A673 sind neuroepitheliome Hirntumorzellen mit endogen exprimierter neuronaler NO-Synthase, die freundlicherweise von J-P. Boissel aus Mainz (Johannes Gutenberg-Universität, Institut für Pharmakologie) zur Verfügung gestellt wurden (ECACC 85111504). Diese Zelllinie wurde in IMDM-Medium mit 10% FBS kultiviert. A673 Zellen sind sehr Trypsin-empfindlich und durften daher zum Passagieren nur sehr kurz inkubiert werden (Giard et al., 1973; McCune et al., 1993).

### **2.2.3.2 DLD-1**

DLD-1 sind humane Kolon-Adenokarzinomzellen, generiert aus einem kolorektalen Adenokarzinom (Dexter et al., 1981). DLD-1 wurden in DMEM mit 10% FBS kultiviert. Sie exprimierten nach Inkubation mit Cytokinen (TNF-alpha 100 U/ml, INF-gamma 100 U/ml, IL-1 beta 10 µg/ml) die induzierbare NOS-Isoform. Hierzu wurden konfluente Zellen in 6-Loch Makroplatten vor der 8-stündigen Cytokin-Behandlung zunächst 16h mit oder ohne FBS inkubiert. Die Serum-freie Phase sollte der Synchronisation der Zellen und somit einer besseren iNOS-Induktion dienen (Kleinert et al., 1998).

### **2.2.3.3 EA.hy 926**

EA.hy 926 ist eine humane endotheliale Zelllinie. Sie wurde durch Fusion der humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzelllinie A549/8 mit humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) hergestellt. Endogen verfügen diese Zellen über die endotheliale NOS-Isoform. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Cora-Jean S. Edgell von der University of North Carolina at Chapel Hill, USA zur Verfügung gestellt. EA.hy926 Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FBS kultiviert (Edgell et al., 1983).

### **2.2.3.4 ECV 304 / ECV 304 N-III-2**

ECV 304 wurde als „humane endotheliale Zelllinie“, die durch „spontane Transformation“ entstanden ist, von ATCC (ECACC 92091712) bezogen und zur stabilen Transfektion mit humaner endothelialer NOS verwendet. Diese transfizierten Zellen werden im Folgenden mit ECV 304 N-III-2 bezeichnet. 1999 wurde von ATCC mitgeteilt, dass es sich bei den ECV 304 Zellen nicht um eine humane endotheliale Zelllinie handelt, sondern um einen Subtyp der 1973 generierten Blasenkarzinomzelllinie T-24. Für ECV 304 wurde mit 10% FBS versetztes DMEM-Medium verwendet (Takahashi et al., 1990).

### **2.2.3.5 HaCaT**

HaCaT sind humane Keratozyten-ähnliche Zellen mit endogen exprimierter neuronaler NO-Synthase, die freundlicherweise von Dr. S. Frank (Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt wurden. HaCaT benötigen zum Wachstum mit 10% FBS versetztes DMEM-Medium, sie lösen sich beim Passagieren nur sehr schwer ab und müssen daher bis zu 10 min mit Trypsin/EDTA inkubiert werden (Boukamp et al., 1988).

### 2.2.3.6 HEK-GC

HEK-GC-Zellen wurden freundlicherweise von Andreas Friebe (Ruhr-Universität Bochum, Institut für Pharmakologie und Toxikologie) zur Verfügung gestellt. In dessen Labor wurden HEK293 Zellen mit den Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  (in pcDNA3.1, Invitrogen) der löslichen Guanyl-Cyclase transfiziert. Diese Zelllinie wurde in DMEM mit 5% FBS sowie 1% Pen/Strep kultiviert und sollten eine Alternative zu den langsam wachsenden RFL-6 Reporterzellen darstellen (Yirrell et al., 1983).

### 2.2.3.7 HUVEC

Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) sind primäre Endothelzellen, die endogen die endotheliale NOS exprimieren. Die Zellen wurden zum einen von Promocell (Heidelberg) bezogen und nach dem mitgelieferten Protokoll kultiviert. Dem „Endothelial Cell Growth Medium“ (Promocell) wurde ein spezieller „Supplement Mix“ zugesetzt, der folgende Komponenten enthielt: 0,4% ECGS/H (Endothelial Cell Growth Supplement), 2% FBS, 0,1 ng/ml epidermaler Wachstums-Faktor, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Hydrocortison, 1 ng/ml „Basic Fibroblast-Factor“, 50 ng/ml Amphothericin B, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamicin. Eine andere Bezugsquelle waren HUVECs, die in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz aus Nabelschnüren isoliert wurden. Diese Zellen wuchsen in Medium 199 mit 20% FBS sowie den Antibiotika Penicillin und Streptomycin. HUVECs mussten grundsätzlich auf Fibronectin oder Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen wachsen und konnten nur bis zur 3. Passage verwendet werden (Galdal et al., 1984).

### 2.2.3.8 NB-OK-I

Humane Neuroblastomzellen mit endogen exprimierter neuronaler NOS. NB-OK-I-Zellen wurden in DMEM mit 10% FBS gehalten (Forgeur et al., 1999).

### 2.2.3.9 NT-2

NT-2 sind aus embryonaler Testis gewonnene humane Teratokarzinomzellen, die mit Retinsäure zu Neuronen ausdifferenziert werden können. NT-2 Zellen exprimieren die neuronale NOS-Isoform. Aufgrund ihres schnellen Wachstums wurden die Zellen in DMEM/Ham's F12 (1:1)-Medium mit nur 5% FBS kultiviert (Pleasure et al., 1993).

### **2.2.3.10 RFL-6**

RFL-6 sind Fibroblasten aus fötalen Rattenlungen. Sie verfügen über eine gut stimulierbare lösliche Guanylatcyclase, haben jedoch keine endogene NOS. Deshalb wurden sie als Reporterzellen zur Messung der NO-Aktivität von endothelialen Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden von ATCC (CCL-192) bezogen. RFL-6 Zellen wachsen in Ham's F-12 Medium mit 15% FBS (Hay et al., 1982).

### **2.2.3.11 SK-N-MC**

SK-N-MC sind humane Neuroepitheliomzellen, die in DMEM-Medium mit 10% FBS kultiviert wurden. Diese Zellen exprimieren die neuronale NOS-Isoform (Biedler et al., 1973; Barnes et al., 1981).

### **2.2.3.12 TGW-nu-I**

TGW-nu-I sind humane Neuroblastom Zellen, die in Earl's MEM mit 10% FBS kultiviert werden. Diese Zellen exprimieren die neuronale NOS-Isoform (Kato et al., 1989). Die Expression der nNOS mRNA kann nach Retinsäure-induzierter neuronalen Differenzierung gesteigert werden (Ogura et al., 1996). Ebenso kann die NO-Produktion durch die Gabe von BH<sub>4</sub> (das linear und konzentrationsabhängig aufgenommen wird) um das 100-fache erhöht werden (Choi et al., 2003).

## **2.2.4 Bestimmung der Zellzahl**

Um eine definierte Anzahl an Zellen aussäen zu können, wurde zunächst die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl pro ml errechnete sich aus dem Mittelwert der Zellen jedes der 4 Großquadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und der Kammerkonstanten 10<sup>4</sup>.

## 2.3 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.3.1 Reagenzien und häufig verwendete Standardmethoden

#### 2.3.1.1 Puffer und Lösungen

##### DEPC-H<sub>2</sub>O

Diethylpyrocarbonat für 500 ml 162,2 gmol<sup>-1</sup> 100 µl  
12 h bei 37 °C schütteln, anschließend autoklavieren

##### 50 X TAE-Puffer

Tris	400 mM	121,1 gmol <sup>-1</sup>	242,2 g
EDTA	· 10 mM	372,24 gmol <sup>-1</sup>	18,6 g
2H <sub>2</sub> O			

mit H<sub>2</sub>O<sub>entmin.</sub> ad 1000 ml

Lösung mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen und anschließend autoklavieren

##### 1 X TAE-Laufpuffer

50 x TAE-Puffer	40 ml
-----------------	-------

mit H<sub>2</sub>O<sub>entmin.</sub> ad 2000 ml

##### 10 X TE-Puffer

Tris	100 mM	121,1 gmol <sup>-1</sup>	1,21 g
EDTA	· 10 mM	372,24 gmol <sup>-1</sup>	0,37 g
2H <sub>2</sub> O			

mit H<sub>2</sub>O<sub>entmin.</sub> ad 100 ml

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und anschließend autoklavieren

##### Natriumacetat-Lösung pH 4,0

Na-Acetat	2 M	45,34 gmol <sup>-1</sup>	16,4 g
-----------	-----	--------------------------	--------

mit H<sub>2</sub>O<sub>entmin.</sub> ad 250 ml

mit 100 ml Eisessig auf pH 4,0 einstellen, auf 250 ml auffüllen, autoklavieren

##### 10 X Probenpuffer

Saccharose	67 % (w/v)	342,3 gmol <sup>-1</sup>	
Bromphenol-	0,05 % (w/v)	691,9 gmol <sup>-1</sup>	
blau			

GIT-Puffer (Stocklösung)

Guanidiniso- thiocyanat	4 M	118,16 gmol <sup>-1</sup>	250 g
Natrium Citrat pH 7	25 mM	750 mM	17,6 ml
Na-Lauroyl- sarcosyl	0,5 %	10 %	26,4 ml
DEPC-H <sub>2</sub> O			293 ml

Guanidinisothiocyanat in H<sub>2</sub>O bei etwa 60 °C lösen

Stocklösung 3 Monate bei 20-25 °C haltbar

Vor Gebrauch 0,36 ml β-Mercaptoethanol pro 50 ml Stock zusetzen

Gebrauchslösung 1 Monat bei 20-25 °C haltbar

750 mM NaCitrat

Natrium Citrat		294,1 gmol <sup>-1</sup>	44,115 g
		mit H <sub>2</sub> O <sub>entmin.</sub> ad	200 ml

mit 0,1 N HCl auf pH 7 einstellen, autoklavieren

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)10% Natrium-LauroylsarcosylWasser-gesättigtes Phenol

Phenol		94,11 gmol <sup>-1</sup>	1 kg
--------	--	--------------------------	------

Das bei 4 °C gelagerte kristalline Phenol bei 68 °C schmelzen. Nach Zugabe von 1,3 l DEPC-Wasser über Nacht bei 4 °C rühren und anschließend bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahren.

## 2.3.1.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.3.1.2.1 Agarosegelelektrophorese

Als Standardmethode zur Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Molekülen aus Amplifikationsreaktionen oder Restriktionsansätzen wurde die nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Hierzu wurden 1- bis 2%-ige Gele je nach Probenanzahl im Miniformat (5 x 6,5 cm) oder Midiformat (10 x 15 cm) verwendet. Die Gelherstellung erfolgte durch vollständiges Lösen der entsprechenden Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer (30 ml für Mini- und 100 ml für Midi-Gele) in der Mikrowelle durch 3-maliges Aufkochen und der anschließenden Zugabe von 6 bzw. 20 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml). Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern bei 60-100 V. Die Detektion der Nukleinsäuren wurde durch Interkalation von Ethidiumbromid-Molekülen ermöglicht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf einen Transilluminator gelegt. Die Banden waren aufgrund einer orangeroten Fluoreszenz-Emission von Ethidiumbromid bei 560 nm sichtbar. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der Multi-Analyst Software v1.0.1 von BioRad.

### 2.3.1.2.2 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion ist eine Standard-Methode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten, da es ein sehr guter Wasserstoffbrückenbildner ist und außerdem hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten ausbilden kann. Die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der Interphase an, die Löslichkeit der Nukleinsäuren bleibt davon unbeeinflusst.

Zur Extraktion wurden Reaktionen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  auf 200 µl aufgefüllt und die Lösung dann mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) Mischung versetzt. Nach gründlichem Vortexen musste die Suspension bei 14000 x g zentrifugiert werden, bevor die wässrige Oberphase abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt werden konnte. Zur vollständigen Entfernung eventuell vorhandener Phenolreste wurde der Ansatz erneut mit 1 Volumen Chloroform extrahiert.



### 2.3.1.2.3 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Aufkonzentrierung nukleinsäurehaltiger Lösungen wurde standardmäßig die Ethanolpräzipitation angewendet. Durch monovalente Kationen und Alkohole können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat sowie 2 Volumen Ethanol versetzt und entweder eine Stunde bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt. Nach einem anschließenden Waschschrift mit 70%-igem Ethanol wurde das getrocknete Pellet in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  aufgenommen.

### 2.3.1.2.4 Fotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA oder DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Standardmäßig wurde die Konzentration für RNA- und DNA-Proben spektrometrisch in Quarzküvetten mit Hilfe eines Fotometers (Gene Quant Amersham) bestimmt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In der Regel wurden 99  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  oder Puffer in einem Eppendorfgefäß vorgelegt, 1  $\mu\text{l}$  der Nukleinsäure-Probe hinzupipettiert, durchmischt und zur Bestimmung der Extinktion bei 260 nm in eine Quarzküvette überführt. Um zusätzlich die Reinheit der Lösung zu überprüfen, wurde die Extinktion bei 280 nm und 320 nm gemessen. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung kann man an dem Quotient  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  erkennen. Bei 280 nm absorbieren beispielsweise aromatische Aminosäuren und Phenol. Der Quotient gibt also Aufschluss darüber, inwieweit die Lösung mit Proteinen oder Phenolresten verunreinigt ist. Das Verhältnis für „reine“ DNA-Präparationen sollte 1,8 und für „reine“ RNA-Präparationen  $\geq 2,0$  betragen, Die  $\text{OD}_{320\text{nm}}$  sollte Null betragen, da Nukleinsäuren diese Wellenlänge nicht absorbieren (Sambrook und Russel, 2001).

Den Konzentrationsberechnungen wurden folgende Richtwerte zugrunde gelegt:

$\text{Extinktion}_{260\text{nm}} = 1 \triangleq$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	bei doppelsträngiger DNA
	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	bei einzelsträngiger DNA und RNA
	45 $\mu\text{g}/\text{ml}$	bei einem Gemisch an doppelsträngiger DNA und RNA

### 2.3.2 Isolation von Gesamt-RNA

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig gegenüber spontanem und enzymatischem Abbau. Die RNA-abbauenden Enzyme kommen ubiquitär vor und sind sehr stabil, das heißt, nach der Denaturierung durch Autoklavieren oder Sterilisation durch trockene Hitze können sie schnell wieder renaturieren (Nicholl, 1999). Aus diesem Grund müssen bei Arbeiten mit RNA besondere Vorkehrungen getroffen werden, um RNase-Kontaminationen zu vermeiden und somit aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Daher wurden grundsätzlich DEPC-Wasser, gestopfte Spitzen sowie ausschließlich für RNA bestimmte Pipetten benutzt. Weiterhin mussten alle Glas- und Plastikwaren RNase-frei sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf den Einsatz spezieller RNase-Inhibitoren verzichtet.

#### 2.3.2.1 RNA-Isolation aus Zellen mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ von QIAGEN

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte in erster Linie mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen. Als Ausgangsmaterial dienten trypsinisierte Zellen einer 10 cm Schale oder einer 6-Loch-Makroplatte. Der Vorteil dieser Isolations-Methode liegt in der schnellen und sauberen Aufarbeitung, mit der innerhalb von 30 Minuten bis zu 100 µg reine Gesamt-RNA z.B. für real time RT-PCR isoliert werden kann. Die Technologie basiert auf der selektiven Bindung von RNA-Molekülen (> 200 Nukleotide) unter Hochsalz-Bedingungen an eine Silica-Gel Membran und anschließende Elution unter Niedrig-Salz-Bedingungen.

Es wurde nach dem Original-Protokoll (RNeasy Mini Handbook, Qiagen, Stand: Juni 2001) des Herstellers verfahren. Die abschließende RNA-Elution von der RNeasy Säule erfolgte 2 x nacheinander mit jeweils 50 µl RNase-freiem Wasser. 1 µl RNA-Lösung diente standardmäßig der Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.3.1.2.4).

#### 2.3.2.2 Saure Phenolextraktion

Eine alternative Methode zur Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Dazu wurden konfluente Zellen auf 10 cm-Kulturschalen zweimal mit PBS gewaschen und danach in 2 x 1,5 ml GIT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein steriles 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 0,1 Vol (300 µl) 2M Na-

Acetat (pH 4,0), 1 Vol (3 ml) H<sub>2</sub>O-gesättigtes Phenol und 0,2 Vol (600 µl) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) pipettiert. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz mindestens 10 sec gemischt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C (Beckmann, JS 13.3 oder JA 14) wurde die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Durch Zugabe von 3 ml Isopropanol und einer Inkubation bei –20°C für 1h oder üN konnte die RNA gefällt werden. Nach Zentrifugation (20 Min., 4°C, 10000 x g) wurde das Pellet zweimal mit 1ml 80% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> resuspendiert und 1µl zur Konzentrationsbestimmung entnommen (Kapitel 2.3.1.2.4).

### 2.3.3 *In vitro*-Transkription

Die absolute Quantifizierung mittels quantitativer „real-time“ RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase Ketten-Reaktion, qRT-PCR) erfordert eine Standardreihe aus *in vitro*-Transkripten der zu untersuchenden mRNA. Die zu transkribierenden Vollängen-cDNAs der 4 untersuchten hCAT-Isoformen (cationic amino acid transporter-1, -2A, -2B, -3) waren bereits innerhalb der Arbeitsgruppe in den geeigneten *in vitro*-Transkriptionsvektor pSP64T (Kapitel 2.1.8, Closs et al., 1997) kloniert worden und sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Da die Konstrukte für die Transkriptionsreaktion in linearisiertem Zustand vorliegen mussten, sind die entsprechenden Restriktionsenzyme ebenfalls der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

**Tabelle 2.1: Plasmidkonstrukte mit den inserierten humanen CAT-Isoformen.** Hervorgehoben sind die Restriktionsenzyme, die am häufigsten zur Linearisierung verwendet wurden.

hCAT-Isoform	Name des Konstruktes	Enzyme zur Linearisierung
hCAT-1	pSPPhCAT1-AB1C	<b>EcoR I</b> , Sal I, Xba I, BamH I, Xma I, Afl III
hCAT-2A	hCAT2A-118	<b>BamH I</b> , Afl III, Sal I, Acc I
hCAT-2B	hCAT2B-181	<b>Sal I</b> , Acc I, Xma I, Afl III
hCAT-3	HC3.pSP64T	<b>Sal I</b> , Afl III

### 2.3.3.1 Plasmid-Linearisierung und Aufreinigung des Restriktionsansatzes

Der Vektor mit der zu transkribierenden cDNA muss vor der Transkription mit einer Restriktionsendonuklease, die glatte oder 5' überhängende Enden erzeugt, linearisiert werden. Die Restriktion erfolgte standardmäßig mit 20 µg Plasmid-DNA und 80 U Enzym in 200 µl Ansätzen über Nacht. Zur Überprüfung der Linearisierung wurden 10 µl in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Im Anschluss an die Restriktion wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt und das Pellet in 40 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (DEPC-H<sub>2</sub>O) aufgenommen.

### 2.3.3.2 Transkriptionsreaktion

Die Synthese der *in vitro* Transkripte erfolgte mit dem „mMessage mMaschine SP6 Kit“ der Firma Ambion. Der Transkriptionsansatz wurde jedoch modifiziert, da dieser Kit am 5'-Ende der transkribierten mRNA ein 7'-Methylguanosin-Cap anfügt. Da diese Modifikation für die Verwendung der *in vitro* Transkripte in der RT-PCR nicht notwendig ist, konnte der NTP/CAP-Mix durch normale NTPs (je 10 mM) ersetzt werden.

Zur Durchführung eines Standard-Transkriptionsansatzes wurden die folgenden Reagenzien bei 20-25°C in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

NTPs (je 10 mM)	10 µl
Linearisierte DNA	1 µg
Enzym Mix (SP6 RNA Polymerase)	2 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl
Nuclease-freies Wasser	18 µl

Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C schloss sich eine 15-minütige DNase I-Inkubation zur Degradation der eingesetzten DNA an.

### 2.3.3.3 Aufreinigung der *in vitro*-Transkripte

Für nachfolgende RT-PCR-Reaktionen wurden reine *in vitro* Transkripte benötigt. Die Aufreinigung der synthetischen Transkripte erfolgte mit „RNeasy Mini Säulen“ (Qiagen) nach dem RNA „Clean-up“-Protokoll (RNeasy Mini Handbook 06/2001). Nach der Elution mit 2 x 20 µl RNase-freiem Wasser wurde der Ansatz erneut 15 Minuten mit DNase I bei 37°C inkubiert und die gleiche Aufreinigung ein zweites Mal durchgeführt.

### 2.3.3.4 Berechnung der Molekülzahl am Beispiel von hCAT-1

Zur absoluten Quantifizierung von mRNAs mit Hilfe der quantitativen RT-PCR ist es notwendig, die genaue Anzahl der eingesetzten *in vitro*-Transkripte der Standardreihe zu kennen. Wenn die Länge des *in vitro*-Transkriptes bekannt ist, kann die Teilchenzahl mit den unten aufgeführten Gleichungen errechnet werden. Als Beispiel folgt die Berechnung der Molekülzahl des hCAT-1-Transkriptes mit einer Länge von 2200 Basenpaaren (bp) anhand des gemittelten Molekulargewichts einer Ribonukleotidbase von 340 Da.

$$1 \text{ Mol} = 2200 \text{ bp} \times 340 \text{ Da} = 748000 \text{ g (748 kDa)} = 6,023 \times 10^{23} \text{ Moleküle}$$

$$1 \text{ g} = 6,023 \times 10^{23} / 748000 \text{ g} = 8,0521 \times 10^{17} \text{ Moleküle}$$

Aus einer aufgereinigten hCAT-1 mRNA, ausgehend von einer 1 ng/µl Stammlösung, errechnet sich somit die folgende Verdünnungsreihe (1:10) mit den entsprechenden Molekülen:

	Menge	Moleküle
Verdünnung 1	1 ng	$8,0521 \times 10^8$
Verdünnung 2	100 pg	$8,0521 \times 10^7$
Verdünnung 3	10 pg	$8,0521 \times 10^6$
Verdünnung 4	1 pg	$8,0521 \times 10^5$
Verdünnung 5	100 fg	$8,0521 \times 10^4$
Verdünnung 6	10 fg	$8,0521 \times 10^3$

### 2.3.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt. Die RT-PCR ist eine hochsensible Methode, mit der man die Genexpression auf der Stufe der RNA untersuchen kann (Newton, 1994). Um RNA mit Hilfe einer RT-PCR nachzuweisen, hybridisiert man ein Oligonukleotid (Oligo-dT, Random Oligomer oder sequenzspezifisch) an die RNA-Matrize und erstellt mittels reverser Transkriptase (bei 50°C) eine cDNA-Kopie. Mittels PCR können dann bestimmte Sequenzbereiche einer DNA millionenfach amplifiziert werden. Dazu werden sequenzspezifische Oligonukleotide benötigt, die die beiden Enden der zu amplifizierenden Bereiche definieren. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei etwa 94-95°C. Nach Abkühlung auf eine von der Oligonukleotid-Sequenz abhängigen Schmelz-Temperatur erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotide an die einzelsträngigen DNA-Moleküle. Anschließend beginnt eine DNA Extension durch thermostabile Polymerasen (z.B. HotStarTaq DNA Polymerase, QIAGEN) bei 72°C. Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte erfolgt eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA Fragments. Da sich die Zahl der DNA-Moleküle bei jedem Syntheseschritt verdoppelt, entstehen theoretisch bei n Amplifikationen  $2^n$  Moleküle.

Die Auswahl der sequenzspezifischen Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des Programms „Primer Express“ Version 1.5 (Applied Biosystems). Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, war die zur Matrizen DNA homologe Sequenz, wenn möglich, mindestens 20 Nukleotide lang. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass das 3'-Ende jedes Oligonukleotids möglichst aus einem Guanosin oder Cytosin besteht, um eine bestmögliche Hybridisierung zu erreichen.

Die One-Step RT-PCR wurde mit dem „QuantiTect“ RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in einem 50 µl Reaktionsvolumen mit 0,5 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Die cDNA wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden aus Kapitel 2.1.7.1 amplifiziert.

## Standard RT-PCR Ansatz für iCycler

	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
“2 x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix”	25 µl	1 x
Sense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,4 µM
Antisense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,4 µM
QuantiTect Probe RT Mix	0,5 µl	0,5 µl/Reaktion
RNase-freies Wasser	variabel	
Gesamt-RNA	variabel	0,5 µg
Endvolumen	50 µl	—

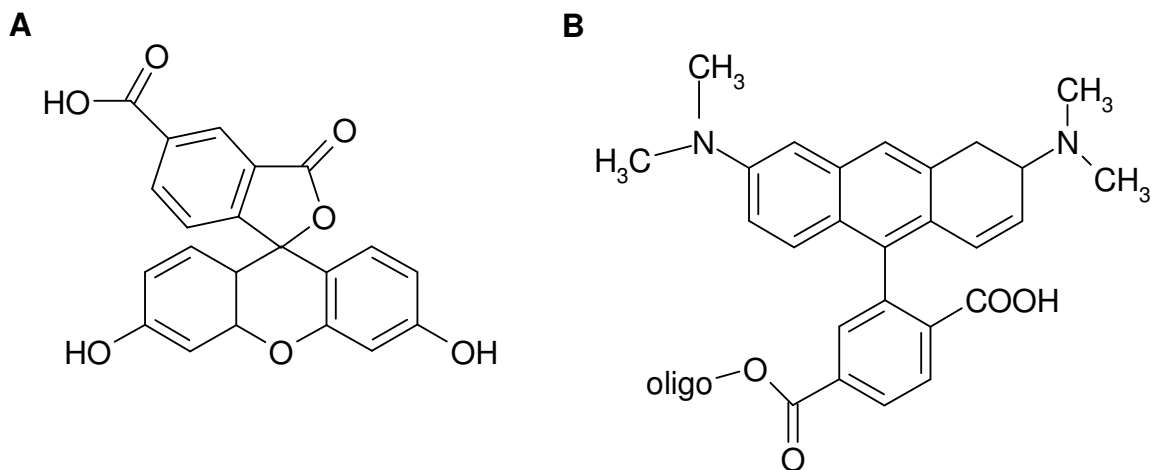
## Standard RT-PCR Profil

Reverse Transkription	50 °C	30 min	
Initialer Aktivierungsschritt	95 °C	15 min	Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase Inaktivierung der RT-Enzyme
3-Schritt-Zyklen			
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	x °C	30 sec	In Abhängigkeit der Oligonukleotid-Sequenz
Extension	72 °C	60 sec	
Zyklenzahl		35-45	
Abschließende Extension	72 °C	10 min	
Ende	4 °C	∞	

**2.3.4.1 Quantitative „real time“ RT-PCR (qRT-PCR)**

Im Unterschied zu einer konventionellen RT-PCR ermöglicht die „*Real-time*“ qRT-PCR eine direkte Detektion von PCR Produkten durch Fluoreszenzsignale. Aufgrund der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt eine Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Probe erfolgen. Die Detektion kann entweder mit dsDNA bindenden Fluorochromen (z.B. *SYBR Green I*, nicht-sequenzspezifisch) oder mit fluorogenen Sonden (z.B. *TaqMan* Sonden, *FRET* Sonden oder *Molecular Beacons*, sequenzspezifisch) erfolgen.

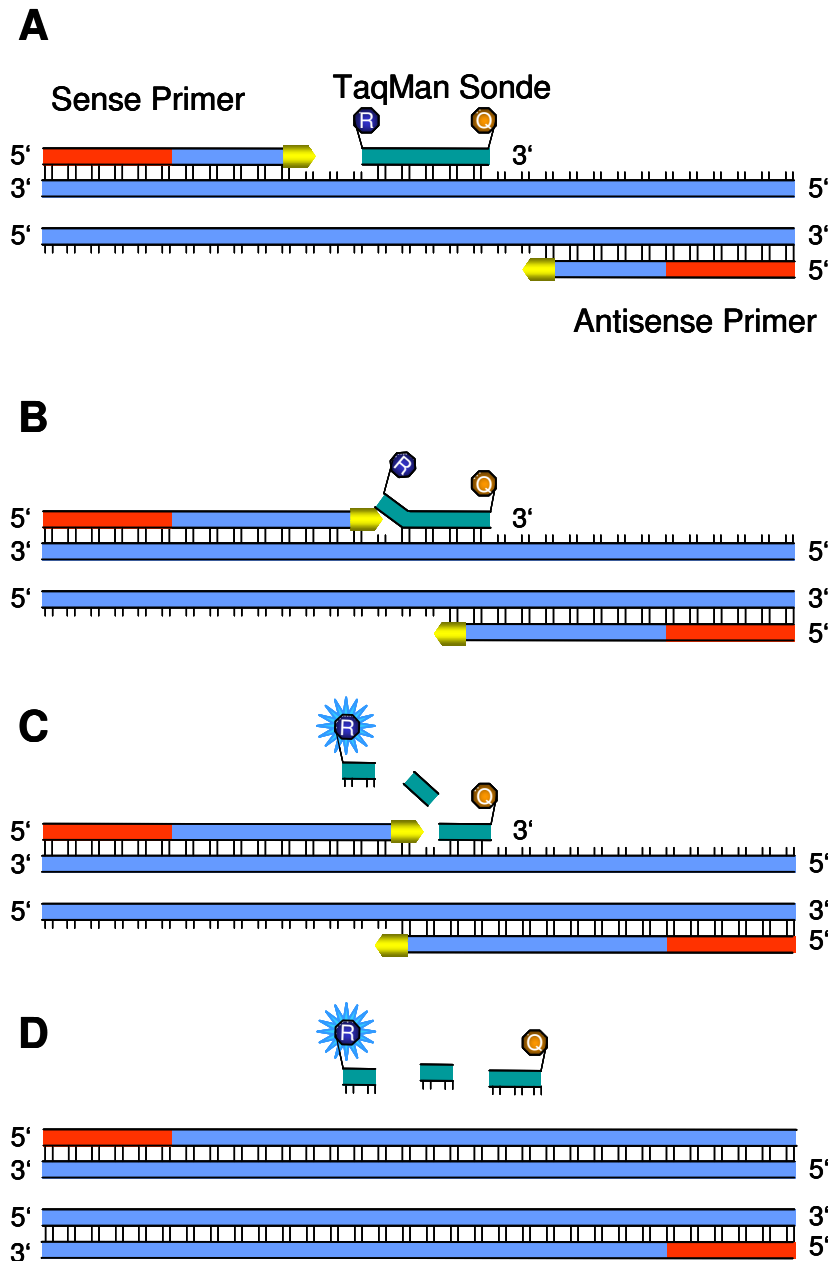
Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TaqMan Sonden, auch als „*dual-labeled probes*“ bezeichnet, zeichnen sich durch einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende (6-Carboxyfluorescein, FAM) sowie einem „Quencher“-Farbstoff am 3'-Ende (TAMRA) aus. Sind beide Fluoreszenz-Farbstoffe an der Sonde gebunden, wird die Reporterfarbstoff-Emission „gequencht“. Dies geschieht entweder durch die Energieübertragung auf den „Quencher“, der ebenfalls Licht einer bestimmten, aber anderen Wellenlänge emittiert oder aber durch einen sogenannten „Dark-Quencher“, der die erhaltene Energie in Form von Wärme abgibt.



**Abbildung 2.2: Reporter- und Quencher-Fluoreszenz-Farbstoffe von TaqMan Sonden.** **A.** Alle verwendeten TaqMan Sonden tragen den Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) am 5'-Ende. Er absorbiert Licht von der Wellenlänge 492 nm und emittiert bei 515 nm. **B.** Der Quencher TAMRA am 3'-Ende der Sonde hat ein Absorptionsmaximum bei 555 nm und eine Emission bei 580 nm. Bei räumlicher Nähe zu einem Reporter kann er dessen Energie durch Übertragung (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) aufnehmen und selbst bei höherer Wellenlänge emittieren. Sogenannte „Dark-Quencher“ geben diese Energie stattdessen in Form von Wärme ab. TAMRA kann alternativ auch als Reporter-Farbstoff eingesetzt werden.

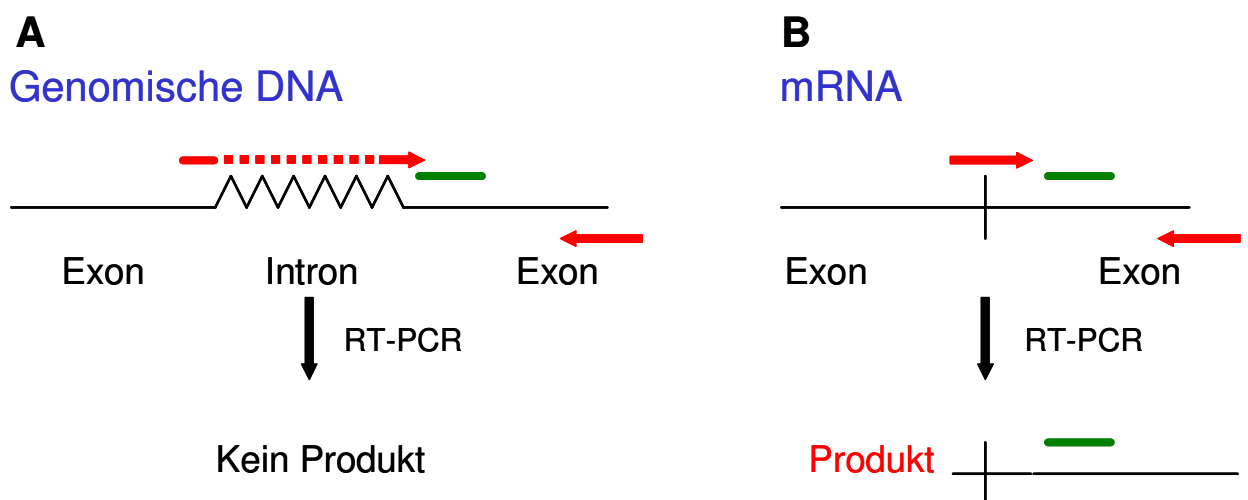
Während des Extensionszyklus wird die TaqMan Sonde aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten. So kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und die Reporterfarbstoff-Emission wird freigesetzt. Das Fluoreszenzsignal kann dann durch die entsprechenden Wellenlängen-spezifischen Filter selektiert und durch eine interne CCD-Kamera aufgezeichnet werden.





**Abbildung 2.3: Prinzip von TaqMan Sonden in einer quantitativen real time PCR.** **A.** Sowohl die Primer als auch die TaqMan Sonde binden während des Annealings an die Zielsequenz. Die TaqMan Sonde trägt zwei Fluoreszenz-markierte Farbstoffe, einen Reporterfarbstoff (R; FAM) am 5'- und einen Quencherfarbstoff (Q; TAMRA) am 3'-Ende. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Reporterfluoreszenz verhindert. **B.** Während der Extension verlängert die DNA-Polymerase die Primer und beginnt die Sonde abzubauen. **C.** Die 5'-Exo-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase spaltet den Reporterfarbstoff von der Sonde ab. **D.** Ist der Reporter einmal vom Quencher getrennt, kann er seine charakteristische Fluoreszenz abstrahlen. Die Polymerisation wird abgeschlossen.

Die Auswahl der sequenzspezifischen Oligonukleotide sowie der TaqMan Sonde erfolgte mit Hilfe des Programms „*Primer Express*“ Version 1.5 (Applied Biosystems). Die optimale Oligonukleotidlänge beträgt 15-20 Basen mit einem G/C-Gehalt zwischen 20 und 70%. Ihr Schmelzpunkt ( $T_M$ -Wert) soll nicht mehr als 1-2°C unterschiedlich sein und zwischen 58 und 60°C liegen. Die Sonde soll etwa 30 Basen lang sein, mit einem  $T_M$ -Wert von 10°C über dem der beiden Oligonukleotide. Der G/C-Gehalt soll bei etwa 50% liegen. Die Sonde darf nicht mit den Oligonukleotiden überlappen oder zu ihnen komplementär sein. Sie darf kein G an ihrem 5'-Ende haben, da diese Base die Reporterfarbstoff-Emission nach der Abspaltung „quenchen“ würde. Die optimale Amplifikatlänge für eine „real-time“ PCR liegt zwischen 100 und 150 Basenpaaren. Kürzere PCR-Fragmente amplifizieren effizienter als längere und sind toleranter gegenüber den Reaktionsbedingungen. Beim Oligonukleotid- und TaqMan-Sondendesign ist weiterhin zu beachten, dass das Amplifikat bzw. ein Oligonukleotid über eine Exon-Grenze hinwegführen sollte, um eine Amplifikation von möglicherweise vorhandener genomischer DNA zu vermeiden.



**Abbildung 2.4: Oligonukleotid- und Sondenauswahl zur Eliminierung von Signalen durch mögliche Kontamination mit genomischer DNA.** Eine Hälfte des Oligonukleotids hybridisiert am 3'-Ende des einen Exons, die andere am 5'-Ende des nächsten Exons. Dadurch bindet das Oligonukleotid lediglich an cDNA synthetisiert aus mRNA (**B**), nicht aber an genomische DNA (**A**). Dies verhindert die Detektion von kontaminierter DNA.

Die One-Step qRT-PCR wurde mit dem „QuantiTect RT-PCR Kit“ (Qiagen, Hilden, Germany) in einem 25 µl Reaktionsvolumen mit 0,5 µg Gesamt-RNA durchgeführt, dNTPs und MgCl<sub>2</sub> wurden zusätzlich hinzugefügt. Die cDNA wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden aus Kapitel 2.1.7.1 amplifiziert, die TaqMan Sonden sind Kapitel 2.1.7.2 zu entnehmen.

#### Standard qRT-PCR Ansatz

	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
“2 x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix”	25 µl	1 x
Sense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Antisense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,8 µM
TaqMan Sonde (10 µM)	1 µl	0,4 µM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,75 µl	5,75 mM
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl	je 400 µM
QuantiTect Probe RT Mix	0,5 µl	0,5 µl/Reaktion
RNase-freies Wasser	variabel	
Gesamt-RNA	variabel	0,5 µg
Endvolumen	25 µl	—

#### Standard qRT-PCR Profil für iCycler

Reverse Transkription	50 °C	30 min	
Initialer Aktivierungsschritt	95 °C	15 min	Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase Inaktivierung der RT-Enzyme
2-Schritt-Zyklen			
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing/Extension	60 °C	30 sec	Temperaturoptimum der Exonukleaseaktivität
Zyklenzahl		50	
Ende	4 °C	∞	

## 2.4 Biochemische Arbeiten auf Proteinebene

### 2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zelllysate bestehen in der Regel aus komplexen Gemischen verschiedenster Proteine und anderer Verbindungen. Die Proteine werden häufig mit Hilfe von Farbreaktionen funktioneller Gruppen mit farbstoffbildenden Reagenzien quantitativ nachgewiesen. Die Intensität des Farbstoffes korreliert dabei direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen im Protein und kann fotometrisch exakt gemessen werden.

Die nach M.M. Bradford benannte und 1976 veröffentlichte Methode beruht auf dem Einsatz von blauen Säurefarbstoffen, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Protein-Assay von BioRad wird mit Coomassie-Brillantblau G-250 durchgeführt, dessen Absorptionsmaximum verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen und im sauren Millieu von 465 nm zu 595 nm. Grund dafür ist wahrscheinlich die Farbstoff-Stabilisierung durch die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine, wobei die Wechselwirkung mit Arginin die wichtigste ist. Daraus ergibt sich auch die Problematik, dass gleiche Mengen an verschiedenen Proteinen erhebliche Differenzen in ihren resultierenden Absorptionskoeffizienten verursachen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Zur Quantifizierung wurden standardmäßig 10 µl Proteinlösung plus 90 µl dH<sub>2</sub>O mit 100 µl BioRad-Reagenz (40%-ige Lösung) in 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe von 0 bis 6 µg in einem Endvolumen von 100 µl. Sowohl Proben als auch Standards wurden in Doppelwerten bestimmt. Nach einer 5-10 minütigen Inkubation folgte die Messung der Extinktion bei 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer. Die Proteinkonzentration errechnete sich aus der anhand des Standards erstellten Eichgerade.

## 2.4.2 Aktivitätsbestimmungen der NO-Synthase

### 2.4.2.1 Lösungen

#### 10 x Locke's Lösung

NaCl	154 mM	58,44 gmol <sup>-1</sup>	90 g
KCl	5,6 mM	74,56 gmol <sup>-1</sup>	4,18 g
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	203,3 gmol <sup>-1</sup>	2,03 g
HEPES	10 mM	238,31 gmol <sup>-1</sup>	23,83 g
NaHCO <sub>3</sub>	3,6 mM	84,01 gmol <sup>-1</sup>	3,02 g
		ad H <sub>2</sub> O <sub>entmin</sub>	1000 ml

Lösung mit NaOH auf pH 7,4 einstellen und anschließend autoklavieren.

Vor Gebrauch 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>entmin</sub> verdünnen und 2 mM CaCl<sub>2</sub> (2 ml einer 1 M Lösung pro Liter 1 x Locke's Lösung) sowie 5,6 mM Glucose (5,6 ml der steril filtrierten 1 M Glucose pro Liter 1 x Locke's Lösung) zugeben.

#### 1 M Glucose

Glucose	1 M	197,17 gmol <sup>-1</sup>	9,9 g
		ad H <sub>2</sub> O <sub>entmin</sub>	50 ml

steril filtrieren und bei 4-8 °C aufbewahren

#### IBMX

IBMX	600 mM	222,3 gmol <sup>-1</sup>	1,34 g
DMSO			10 ml

Aliquots bei -70 °C lagern

#### Superoxid-Dismutase (SOD)

SOD	1000 U/ml		100 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			500 µl

Aliquots bei -70 °C lagern

#### Calcium-Ionophor (A23187)

Ca-Ionophor	10 mM	523,6 gmol <sup>-1</sup>	10 mg
DMSO			1909,8 µl

Aliquots bei -20 °C lagern

#### SIN-1

SIN-1	1 mM	206,7 gmol <sup>-1</sup>	1 mg
Phosphatpuffer pH 5,5	20 mM		4,85 ml

Aliquots lichtgeschützt bei -20 °C lagern

20 x NaAcetat-Puffer

NaAcetat	1 M	82,03 $\text{g mol}^{-1}$	68,04 g
		ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{entmin}}$	500 ml

Essigsäure	1 M		28,5 ml
		ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{entmin}}$	500 ml

NaAcetat zu Essigsäure zugeben, bis pH 4,0 erreicht ist (etwa 250 ml NaAcetat/500 ml Essigsäure). Für den Assay auf 50 mM einstellen (1:20).

Antikörper-Verdünnungspuffer

NaAcetat		50 mM	500 ml
BSA	0,01 %		0,05 g

1 %  $\gamma$ -Globulin-Lösung

NaAcetat		50 mM	100 ml
$\gamma$ -Globulin	1 %		1 g

1 M Tris-HCl pH 7,4

Tris	1 M	121,1 $\text{g mol}^{-1}$	121,1 g
		ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{entmin}}$	1000 ml

Mit HCl auf pH 7,4 einstellen

0,5 M EDTA

EDTA	0,5 M	372,24 $\text{g mol}^{-1}$	18,61 g
		ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{entmin}}$	100 ml

0,5 M EGTA

EGTA	0,5 M	380,4 $\text{g mol}^{-1}$	19,02 g
		ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{entmin}}$	100 ml

Puffer P pH 7,4

Tris/HCl pH 7,4	50 mM	1 M	5 ml
EDTA	0,5 mM	0,5 M	0,1 ml
EGTA	0,5 mM	0,5 M	0,1 ml
		ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{entmin}}$	100 ml

### 2.4.2.2 RFL-6-Reporterzell-Assay

Die Aktivität der konstitutiv exprimierten NOS-Isoformen **eNOS** in „Endothelzellen“

- EA.hy 926
- HUVEC
- ECV 304
- ECV 304 N-III-2

und **nNOS** in „neuronalen“ Zellen

- A673
- HaCaT
- NT-2
- SK-NM-C
- TGW-nu-I

wurde mittels RFL-6 Reporterzell-Assay bestimmt. RFL-6 Zellen sind Fibroblasten aus fötalen Rattenlungen, die über eine gut stimulierbare lösliche Guanylatzyklase, jedoch über keine endogene NOS verfügen. Durch NO, das entweder von NO-Donatoren (z.B. SIN-1) freigesetzt wird oder von NO-produzierenden Zellen stammt, wird die lösliche Guanylat-Cyclase stimuliert und GTP in cGMP umgesetzt. Die cGMP-Produktion ist proportional zur gebildeten NO-Menge und kann damit als Maß für die gebildete NO-Menge verwendet werden. Die cGMP-Menge kann mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt werden. Dazu werden Lysate aus den RFL-6 Zellen mit radioaktiv markiertem cGMP ( $^{125}\text{I}$ -cGMP) und einem Antikörper gegen cGMP inkubiert. Das von den Zellen gebildete cGMP und das  $^{125}\text{I}$ -cGMP konkurrieren um die Bindung mit dem Antikörper. Es kommt zur Bildung von Antikörper-cGMP-/Antikörper- $^{125}\text{I}$ -cGMP-Komplexen, die präzipitiert werden und deren Gehalt an radioaktiv markiertem cGMP in einem Gamma-Szintillationszähler bestimmt werden kann. Aus der Eichkurve errechnet sich die Menge an cGMP, die von den RFL-6 Zellen gebildet wurde.

Zur Versuchsdurchführung wurden sowohl NO-Produzenten als auch die Reporterzellen standardmäßig in 6-Loch-Makroplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Einzige Ausnahme bildeten die TGW-nu-I Neuroblastomzellen, die bereits mit 80-90 %-iger Konfluenz zur NO-Messung eingesetzt wurden. Die NO-Produzenten wurden zunächst zweimal mit je 2 ml Locke's Lösung (LL) gewaschen. Die anschließende Inkubation in 1 ml LL (mit den jeweils angegebenen Aminosäuren für 0,25 bis 4 Stunden und mit 2-3 Pufferwechsel) fand bei 37°C statt. Während der letzten 30 Minuten wurde den Zellen 20 U/ml oder 200 U/ml SOD zugesetzt. Zur NO-Messung ersetzte man schließlich die Inkubationslösung durch die selbe

Lösung, die zusätzlich 600  $\mu\text{M}$  IBMX sowie 10  $\mu\text{M}$  Calcium-Ionophor A23187 enthielt. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde der Überstand auf die RFL-6 Reporterzellen transferiert, die zuvor ebenfalls zweifach mit LL gewaschen und 30 Minuten in LL mit 600  $\mu\text{M}$  IBMX inkubiert worden waren. Nach einer 2-minütigen Inkubation der RFL-6-Zellen (zur Stimulation der löslichen Guanylat-Cyclase) bei 37°C im Wasserbad wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml NaAcetatlösung (pH 4,0) und flüssigem Stickstoff lysiert. Für wiederholte Messungen derselben NO-Produzenten inkubierte man diese erneut mit der Inkubationslösung inklusive IBMX und Calcium-Ionophor und übertrug den Überstand jeweils auf eine neue 6-Loch-Makroplatte mit Reporterzellen.

Bis zur Bestimmung des cGMP-Gehaltes im Radioimmuno-Assay lagerten die RFL-6-Lysate bei -20°C. Für die Messung des Proteingehaltes der NO-Produzenten lysierte man diese für 30 Minuten in 300  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH. Nach Zugabe von weiteren 300  $\mu\text{l}$  0,5 M HCl und 600  $\mu\text{l}$  Puffer P und anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 x g wurden 10  $\mu\text{l}$  der Lösung zur Proteinbestimmung eingesetzt (Kapitel 2.4.1).

Die basale cGMP-Produktion sowie die maximale Stimulierbarkeit der RFL-6 Reporterzellen konnte mit folgenden Kontrollen bei jedem Versuch bestimmt werden. Zum Einen ergab eine 2-minütige Inkubation der RFL-6 Zellen in 1 ml LL mit der entsprechend in diesem Versuch eingesetzten SOD-Menge und 600  $\mu\text{M}$  IBMX den Basalwert. Dieser wurde von allen erhaltenen Werten abgezogen. Zum Anderen zeigte die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  des NO-Donors SIN-1 während der Inkubation die aktuelle Stimulierbarkeit der Reporterzellen an.



### 2.4.2.3 Radioimmuno-Assay (RIA)

Die tiefgefrorenen 6-Loch-Makroplatten wurden aufgetaut und die Zelllysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Lysate 10 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und 10-50 µl des Überstandes in einer Doppelbestimmung im Radioimmuno-Assay (RIA) verwendet. Zur Erstellung einer Eichkurve diente eine serielle Verdünnungsreihe von nicht radioaktiv markiertem cGMP (5 pmol - 0,02 pmol) in Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 4,0). Der letzte Punkt der Eichkurve (Bindung) enthielt kein kaltes cGMP, um so die maximale Bindung des anti-cGMP-Antikörpers an das <sup>125</sup>I-cGMP festzustellen. Allen Proben wurden 100 µl <sup>125</sup>I-cGMP (10000 cpm) und 100 µl des 1:10<sup>-4</sup> verdünnten α cGMP-Antikörpers zugesetzt. Der Leerwert enthielt keinen Antikörper, stattdessen 100 µl 0,01% BSA. Alle Proben, ausgenommen des Total-Wertes, wurden als Doppelbestimmung angesetzt.

Pipettierschema (µl):

Röhrchen	Puffer	Probe/ Standard	<sup>125</sup> I-cGMP 10.000 cpm	AK (5 x 10 <sup>-7</sup> )
Eingesetztes <sup>125</sup> I-cGMP	-	-	100	-
Leerwert	200	-	100	100 (0,01 % BSA)
Bindung	200	-	100	100
Standard	150	50	100	100
Proben	190-150	10-50	100	100

Die gut durchmischten und kurz abzentrifugierten Ansätze inkubierten über Nacht bei 4 °C. Die Präzipitation der cGMP-Antikörper-Komplexe erfolgte nach Zugabe von 50 µl einer 1 %-igen γ-Globulinlösung in Natriumacetatpuffer mit 2,5 ml eiskaltem Isopropanol. Nach kräftigem Mischen zentrifugierten die Proben bei 4000 x g und 4°C für 30 Minuten. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets 2 h getrocknet und anschließend im „Gamma-Counter“ gezählt. Die cGMP-Konzentrationen der Proben wurden anschließend aus der Eichgeraden bestimmt.

#### 2.4.2.4 „NO-Analyzer“

Das biochemische Verhalten von NO beruht vor allem auf seiner Reaktivität gegenüber Übergangsmetallen, vor allem Eisen in Häm und Eisen-Schwefel-Zentren. So ist die wichtigste biochemische Reaktion von NO die Umsetzung mit Oxyhämoglobin, wobei es zu Nitrat oxidiert wird, das wiederum durch die Nitratreduktase zu Nitrit reduziert wird. Die Bestimmung der Nitrit-/Nitrat-Konzentration in Endothelzellen erfolgte alternativ zur Bestimmung des bioaktiven NOs durch den RFL-6 Reporterzell-Assay versuchsweise mit Hilfe eines „NO-Analyzers“ (nach Schmidt et al., 1992). Die Proben werden dazu mit Nitrat-Reduktase vorbehandelt, wodurch das in den Proben enthaltene Nitrat zu Nitrit reduziert wird. Das Nitrit wird anschließend durch Zugabe von Jodid in saurem Medium zu NO reduziert. Das NO reagiert mit Ozon, welches vom „NO-Analyzer“ aus Sauerstoff generiert wird, zu angeregtem Stickstoffdioxid. Anschließend relaxiert das angeregte Stickstoffdioxid unter Lichtemission in den Grundzustand. Das emittierte Licht wird über einen Photomultiplier gemessen und ist ein Maß für die Nitrit-/Nitrat-Konzentrationen in den Proben. Die genauen Konzentrationen werden durch parallele Messung von Standard-Proben ermittelt.

Zur Bestimmung der Nitrit-/Nitrat-Konzentration wurden konfluente EA.hy 926-Zellen zweimal mit LL gewaschen und anschließend 0,25 bis 2 Stunden in LL mit den angegebenen Aminosäuren bei 37°C vorinkubiert. Ein Pufferwechsel erfolgte hierbei drei- bis viermal. Zur eigentlichen Messung wurden nun die vorbehandelten Zellen für 15 Minuten in 300 µl LL plus den angegebenen Aminosäuren in Gegenwart von Calcium-Ionophor inkubiert. Die negative Kontrolle inkubierte ohne Calcium-Ionophor. Der Überstand konnte dann nach Abnahme entweder eingefroren oder zur Nitrat-Reduktase-Behandlung verwendet werden. Analog zum RFL-6-Reporterzell-Assay erfolgte eine Proteinbestimmung der Endothelzellen (Kapitel 2.4.1).

Zur enzymatischen Reduktion des Nitrats zu Nitrit wurden 100 µl der Überstände mit 0,1 U/ml Nitrat-Reduktase, 5 µM FAD und 0,1 mM NADPH versetzt und 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Je 50 µl der Proben oder des Eichstandards (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 pmol/50 µl) wurden über einen automatischen Probengeber in das Reaktionsgefäß des NO-Analysers, das eine KJ-Lösung (100 mM, 37 °C, pH 4,0) enthielt, eingeschleust und 2 min inkubiert. Das Austreiben des gebildeten NOs aus dieser Reaktionslösung und das Überleiten in den NO-Analyser erfolgte durch Evaporieren des Reaktionsgefäßes und Durchleiten von Stickstoff. Danach wurde die Reaktionslösung und das Reaktionsgefäß mit Stickstoff gespült und vor dem Einschleusen der nächsten Probe evaporiert.

Die Steuerung des Probengebers sowie des NO-Analysers (Durchleiten von Stickstoff, Evaporieren und Druckausgleich) erfolgte vollautomatisch über ein Steuerungsgerät, das in der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts der Johannes Gutenberg-Universität von Herrn R. Stutz entwickelt und gebaut wurde. Die Nitrit-/Nitrat-Konzentrationen der Proben wurden aus Eichgeraden ermittelt.

### 2.4.3 HPLC-Analyse zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäure-Konzentrationen

#### 2.4.3.1 Lösungen

##### 0,5 M Borat-Puffer

Natriumtetraborat (wasserfrei)	0,5 M	201,22 gmol <sup>-1</sup>	2,5 g
-----------------------------------	-------	---------------------------	-------

ad H<sub>2</sub>O<sub>entmin</sub> 100 ml

Lösung mit 1 M HCl auf pH 10 einstellen und 5 Minuten kochen. Lagerung bei 20-25°C.

##### Orthophthaldialdehyd-(OPA)

##### Reagenz

OPA	0,5 M	134,14 gmol <sup>-1</sup>	100 mg
Methanol			9 ml
Borat-Puffer	0,5 M		1 ml
2-Mercaptoethanol			100 µl

Reagenz ist lichtempfindlich, eine Woche bei 4°C haltbar.

##### Eluent A

Natriumacetat (wasserfrei)		82,03 gmol <sup>-1</sup>	8,2 g
Aqua bidest.			2000 ml
Triethylamin	0,044 %	101,19 gmol <sup>-1</sup>	0,88 ml

Der pH-Wert wird mit 1 M HCl auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird die Lösung über eine Fritte gefiltert und 5 min mit Helium begast.

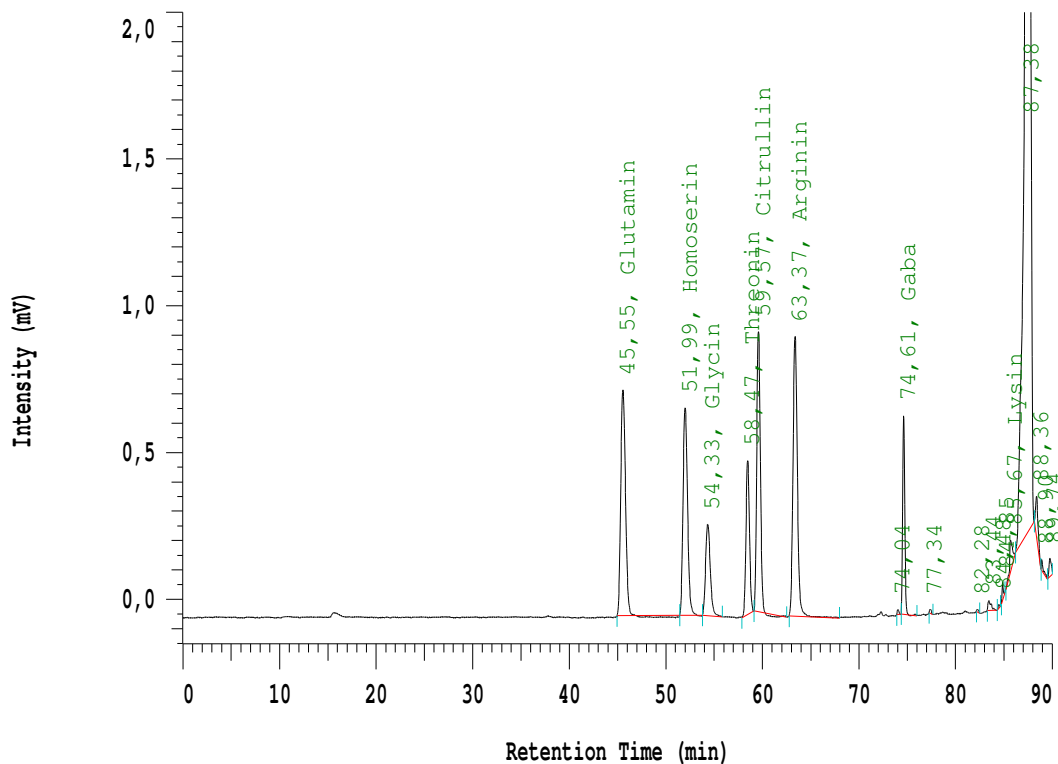
##### Eluent B

Acetonitril

### Herstellung der Standardkurve

Es wurde eine Standardkurve erstellt aus jeweils 10, 8, 6, 4 und 2 nmol L-Glutamin, L-Homoserin, L-Glycin, L-Threonin, L-Citrullin, L-Arginin, L-GABA und L-Lysin:

Dazu wurden aus einer je 1 mM Stock-Lösung 10,8,6,4 und 2 µl in 400 µl Boratpuffer pH 10 pipettiert. Zur Derivatisierung wurden 150 µl dieser Standards im Autosampler mit weiteren 150 µl Boratpuffer und 100 µl OPA Reagenz versetzt. Nach 200 sec wurde die Lösung mit ~ 85 µl Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,5 gebracht. Von diesem Reaktionsgemisch wurden nun 60 µl auf die HPLC-Säule injiziert.



**Abbildung 2.5: Chromatogramm eines Gemischs aus 7 Aminosäuren nach Derivatisierung mit OPA (HPLC).** Die Konzentration betrug jeweils 4 nmol der folgenden Komponenten: Glutamin, Homoserin, Glycin, Threonin, Citrullin, Arginin und GABA. Die Trennung erfolgte auf einer Nova-Pak® C18 4 µm 3.9 x 300 mm reversed-phase HPLC-Säule. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 330 nm Anregung und 450 nm Emission (Fluorimeter Shimadzu RF-530) gemessen.

### 2.4.3.2 HPLC-Bedingungen

Bei der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren durch Derivatisierung mit Fluoreszenzreagenzien erweist sich Orthophthaldialdehyd (OPA) als ein vorzügliches Derivatisierungsmittel, da die Polaritätsbeiträge der einzelnen Aminosäurereste in den Derivatisierungsprodukten stärker als bei anderen Fluorophoren für die Trennleistung zur Geltung kommen. Die unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeiten und Stabilitäten der einzelnen Aminosäure-OPA-Derivate behindern eine quantitative Analytik der HPLC nicht, wenn der Analysengang zeitlich standardisiert und das Derivatisierungsmillieu modifiziert wird.

Durch die Umsetzung hydrophober Fluorophoren werden hydrophile Aminosäuren in hydrophobe Derivate umgewandelt, die an hydrophoben Umkehrphasen (C8- oder C18-Ketten) bei Verwendung wässriger Eluenten zurückgehalten werden. Durch Zusatz organischer Lösungsmittel können die Retentionszeiten verkürzt werden. Die Stärke der Retention eines Derivates nimmt mit abnehmender Polarität des Eluenten ab. Da bei einem Aminosäuregemisch der gebundene Fluorophor für alle Aminosäurederivate gleich ist, sind die Aminosäurereste ausschlaggebend für die Trennung der Derivate. OPA reagiert jedoch nur mit primären Aminen und Aminosäuren, so daß z.B. Prolin und Hydroxyprolin nicht erfasst werden. Durch die Neutralisierung der Derivatisierungslösung mit Essigsäure wird die Reaktion gestoppt und zugleich das Säulenmaterial und Kapillarleitungssystem in der HPLC-Apparatur geschont. Die optimale Reaktionszeit für die OPA-Derivatisierung liegt bei 2-10 Minuten, in unserer Versuchsanordnung beträgt sie 200 Sekunden. Die Leistungsfähigkeit einer Säule liegt für die OPA-Derivate bei etwa 300 Trennungen.

Wie bereits in Kapitel 2.4.3.2 beschrieben, wurden durch Erhöhung des unpolaren Lösungsmittel-Anteils (Eluent B) zunächst die polaren, später auch die unpolaren Aminosäurederivate von der Säule gelöst. Tabelle 2.2 zeigt den Lösungsmittelgradienten zur Auftrennung der Derivate.

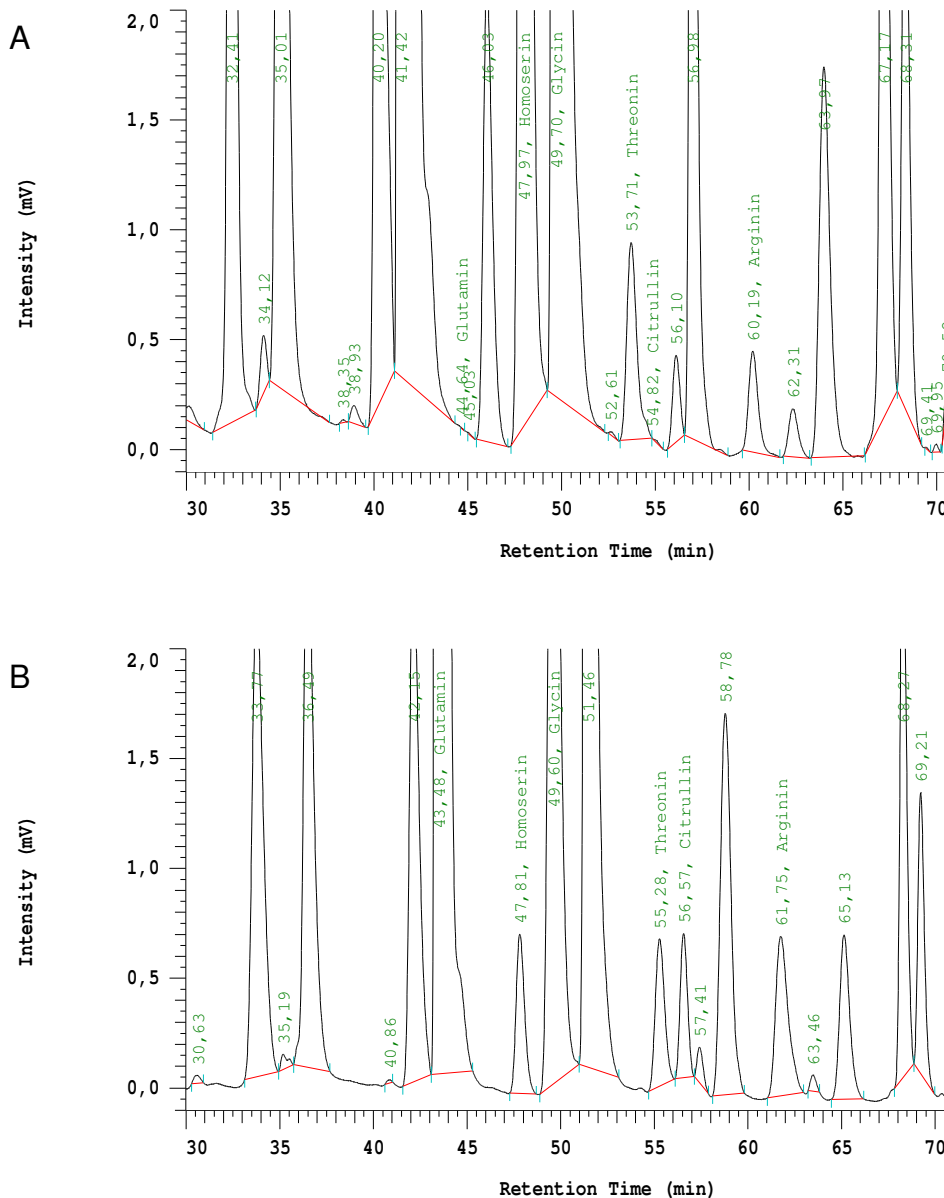
### 2.4.3.3 Durchführung der HPLC-Messung

Da die Messung intrazellulärer Aminosäurespiegel sehr empfindliche HPLC-Methoden (*high performance liquid chromatography*) erfordert, müssen die Aminosäuren mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen derivatisiert werden, um die notwendige Sensitivität zu erreichen. Die Proben konnten mit einem automatischen Probengeber (L-7250, Merck, Darmstadt) mit Orthophthaldialdehyd (OPA) derivatisiert und sofort analysiert werden. Die Aminosäuren-Derivate wurden durch einen Gradienten aus 50 mM Natriumacetat plus 0,044 % Triethylamin (zur schärferen Trennung) (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) auf einer Nova-Pak® HPLC-Säule (C18, 4 µm, 3.9 x 300 mm, Waters, Eschborn) „*reversed-phase*“ mit einer Flußrate von 0,8 ml/min bei einer konstanten Temperatur von 35°C aufgetrennt. Die Säulen-Matrix besitzt Ketten langer unpolarer Gruppen, an die sich die derivatisierten Aminosäuren über hydrophobe Wechselwirkungen anlagern. Die Konzentration des Eluenten B wurde während des HPLC-Verlaufs immer weiter erhöht, wodurch sich auch der unpolare Lösungsmittel-Anteil immer mehr erhöhte. Die polaren Aminosäurederivate lösen sich als erste von der Säule, mit zunehmender Hydrophobizität des Elutionsmittels darauf dann auch die unpolaren. Nach Messung der Fluoreszenz (Anregung 330 nm; Emission 450 nm; Fluorimeter Shimadzu RF-530) wurde das erhaltene Chromatogramm mit dem Programm D-7000 HSM (Merck, Darmstadt) ausgewertet.

Zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen (durchgeführt von Alice Habermeier) wurden konfluente EA.hy926 und A673 Zellen aus Zellkulturschalen (Ø 10 cm) zweifach mit LL gewaschen und in LSL mit den entsprechend angegebenen Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin, L-Glutamin und L-Citrullin je 1 mM) inkubiert. Der 30- oder 120-minütigen Inkubation mit 2 respektive 3 Medienwechseln schloss sich ein dreimaliger Waschschrift mit 5 ml eiskaltem PBS an. Zur Extraktion wurden die Zellen in 70 %-igem eiskaltem Ethanol (EtOH) abgeschabt, dem Homoserin (50 nMol pro 1,5 ml) als interner Standard zugesetzt war. Es folgte eine halbstündige Inkubation bei 4°C sowie eine 10 minütige Sedimentation der Zellrümpfer bei 14000 x g. Im Überstand enthaltene Fette wurden durch zweifaches Ausschütteln mit jeweils 0,5 ml Petrolether entfernt, der verbleibende Extrakt in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt und das Pellet in 400 µl Boratpuffer pH10 resuspendiert.

Um eine präzise Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Aminosäuren zu gewährleisten, wurde in kritischen Fällen zu einer weiteren Probe des Originallysates die zu bestimmende Aminosäure zugesetzt (*gespikt*). Wie in Abbildung 2.6 zu erkennen ist, können so zwei eng nebeneinanderliegende und

auch zum Teil überlappende Peaks identifiziert werden. Zur Derivatisierung wurden, wie bereits oben für die Standards beschrieben, 150 µl Proben im Autosampler mit weiteren 150 µl Boratpuffer versetzt und mit 100 µl OPA Reagenz derivatisiert. Nach 200 sec wurde die Lösung mit ~ 85 µl Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,5 gebracht. Von diesem Reaktionsgemisch wurden nun 60 µl auf die HPLC-Säule injiziert.



**Abbildung 2.6: Chromatogramm zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen in A673 Zellen nach Derivatisierung mit OPA (HPLC).** Injektion von 60 µl Reaktionsgemisch mit Homoserin als internem Standard. Zur exakten Differenzierung zwischen dem Threonin- (53,71) und dem sehr kleinen Citrullinpeak (54,82) in A) wurde in B) dem Zelllysat 5 nmol Citrullin zugesetzt. Die Trennung erfolgte auf einer Nova-Pak® reversed-phase HPLC-Säule (C18, 4 µm, 3.9 x 300 mm). Die Fluoreszenzintensität wurde bei 330 nm Anregung und 450 nm Emission (Fluorimeter Shimadzu RF-530) gemessen.



**Tabelle 2.2: Gradient für die Auftrennung der Aminosäurederivate.** Eluent A = 50 mM Natriumacetat mit 0,044 % Triethylamin (pH 7,0), Eluent B = Acetonitril. Flußrate 0,8 ml/min.

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	0	55	78	22
6	100	0	60	73	27
8	95	5	75	73	27
17	92	8	77	0	100
25	92	8	82	0	100
30	88	12	82,1	100	0
42	82	18	87	100	0

#### 2.4.4 Auftrennung von L-[<sup>14</sup>C]-Citrullin zu L-[<sup>14</sup>C]-Arginin durch Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) dient zur Trennung sowie zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen. Als stationäre Phase dienen Feststoffe oder an Feststoffe adsorbierte Flüssigkeiten, als mobile Phase werden Flüssigkeiten verwendet. Bei Verwendung von Kieselgelplatten werden die Substanzen nach ihrer Polarität getrennt. Unpolare Substanzen werden weniger zurückgehalten und wandern eine größere Strecke auf der DC-Platte (hoher Rf-Wert) als polare Substanzen (niedriger Rf-Wert).

Zur Bestimmung der Konversion von Citrullin zu Arginin wurden konfluente Zellen in 6-Loch-Makroplatten nach zweimaligem Waschen in LL für 30 Minuten oder 2 Stunden bei 37°C in LL plus 1 mM Lysin vorinkubiert. Die Inkubation fand für eine Stunde in Gegenwart von 300 µl LL plus 10 µl <sup>14</sup>C-markiertem Citrullin (18,4 µM; spezifische Aktivität 54,5 Ci/mol; 1 Ci = 37 GBq) bei 37°C statt. Alternativ wurden Zellen 90 Minuten in LL plus 1 mM Lysin vorinkubiert oder ohne Vorinkubation für 30 Minuten mit 10 µl <sup>14</sup>C-markiertem Citrullin in Anwesenheit von 1 mM Lysin inkubiert. Die Hemmung der NOS mit 1 µM L-NAME verhinderte den Umsatz von Arginin zurück zu Citrullin.

Nachdem der Zellüberstand in 1,5 ml Methanol pipettiert wurde, konnten die Zellen zweimal mit eiskalter LL gewaschen werden, bevor sie in 500 µl Methanol abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurden. Als Kontrolle dienten nicht inkubierte Referenzzellen, deren Überstände (300 µl LL) und Lysate entweder mit 10 µl <sup>14</sup>C-markiertem Arginin, Citrullin oder Ornithin versetzt wurden. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 10.000 x g bei 4°C folgte das Einengen von jeweils 400 µl Überstand sowie 133 µl Zelllysat in der „SpeedVac“ zur Trockne. Das Rücklösen der Proben in 6 µl 50 % Methanol geschah durch eine 15-minütige Inkubation im Ultraschallbad. Je 5 µl der Proben und 3 µl der Kontrollen wurden mit Hilfe von Einmal-Kapillarpipetten auf Kieselgel-beschichtete DC-Fertigplatten (20 x 20 cm) aufgetragen und in einer Entwicklungskammer mit 50 ml Laufmittel (Chloroform : Methanol : Ammoniumhydroxid : Wasser 0,5 : 4,5 : 2,0 : 1,0) über eine Strecke von etwa 16 cm aufgetrennt. Der Zusatz des Chloroforms zum Laufmittel erfolgte kurzfristig, die mit Filterpapier ausgeschlagene Kammer musste zur Sättigung bereits einen Tag vor dem Versuch mit Laufmittel gefüllt werden. Nach dem Trocknen der Platte für etwa 30 Minuten konnte ein „Screen“ über Nacht aufgelegt und anschließend im „Phosphoimager“ (Bio-Rad) mit dem Programm „Multi Analyst“ (Bio-Rad) quantitativ ausgewertet werden.



**Abbildung 2.7: Unterschiedliches Laufverhalten von <sup>14</sup>C-Citrullin in der Dünnschichtchromatographie.** Charakteristische Citrullinflecke in 50% Ethanol (1), im Zellüberstand (2) und im Zelllysate (3). Dies zeigt die Abhängigkeit der R<sub>f</sub>-Werte von der Zusammensetzung der mobilen Phase. Auftragung auf Kieselgel-beschichtete DC-Fertigplatten mit Laufmittel Chloroform : Methanol : Ammoniumhydroxid : Wasser (0,5 : 4,5 : 2,0 : 1,0).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Substratversorgung der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

In humanen EA.hy926 Endothelzellen wurden bislang zwei Arginin-Quellen beschrieben, die die eNOS mit ihrem Substrat Arginin versorgen können: Arginin der ersten Quelle ist über kationische Aminosäuretransporter (CAT) austauschbar gegen extrazelluläres Lysin, Arginin der zweiten Quelle hingegen ist nicht gegen extrazelluläres Lysin austauschbar, aber zugänglich für die eNOS (Closs et al., 2000). Die Substratversorgung der eNOS sollte nun in der vorliegenden Arbeit in drei verschiedenen Zelltypen weiter untersucht und charakterisiert werden: EA.hy926 Endothelzellen, humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) und ECV304 Blasenkarzinomzellen, die stabil mit einem Expressionsplasmid für die eNOS transfiziert waren (ECV 304 N-III-2).

#### 3.1.1 Substratversorgung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in EA.hy926 Endothelzellen

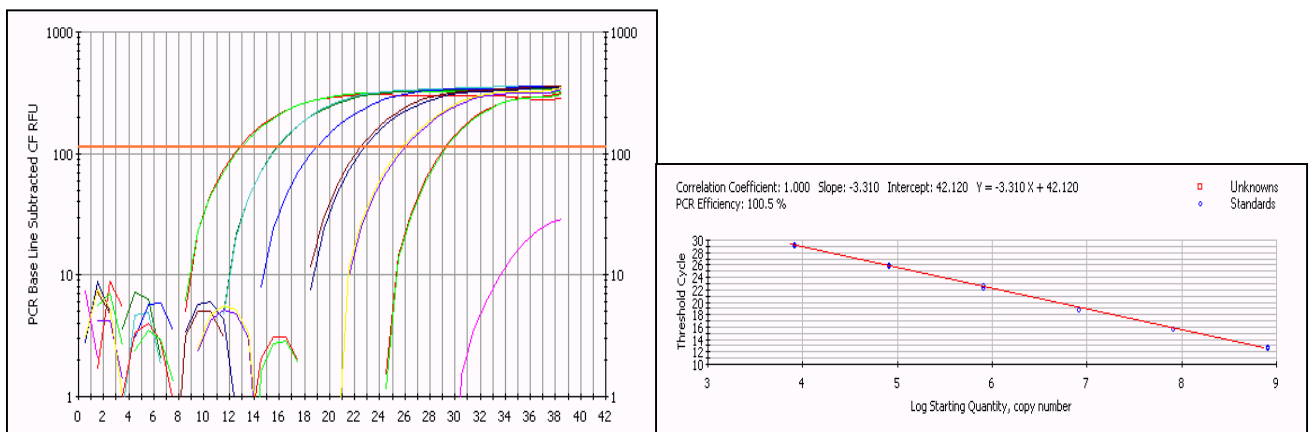
EA.hy926 sind humane endotheliale Zellen, die aus einer Fusion von humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzellen A549/8 mit humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) entstanden sind (Edgell et al., 1983). Sie exprimieren endogen die endotheliale NOS-Isoform (Lindberg et al., 1996). Im Vergleich zu primären Endothelzellen können EA.hy926 über längere Zeiträume kultiviert werden, ohne dabei ihren Endothelzellcharakter zu verlieren und sind daher als Zellkulturmodell bestens geeignet. Im Folgenden sollen EA.hy926 in Bezug auf exprimierte Transportsysteme sowie intrazelluläre Arginin-Quellen näher charakterisiert werden

##### 3.1.1.1 Nachweis der Expression von hCAT mittels quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR)

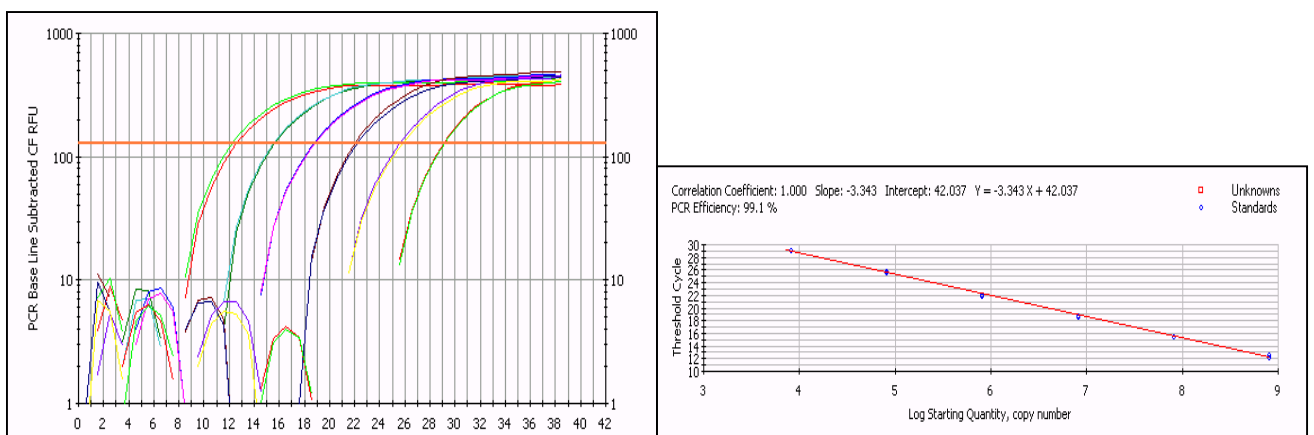
Die Depletion des eNOS-Substrates Arginin kann über diverse Transportsysteme erfolgen. Ein bedeutendes Transportsystem für kationische Aminosäuren stellen hierbei die CAT-Isoformen (cationic amino acid transporter) dar, die dem System  $\gamma^+$  zuzuordnen sind. Eine Inkubation der Zellen in extrazellulärem Lysin führt dabei zu einem Austausch gegen intrazelluläres Arginin und somit zu einer Depletion an intrazellulärem Arginin.

Die Untersuchung der mRNA-Expression der verschiedenen hCAT-Isoformen 1, 2A, 2B und 3 erfolgte in dieser Arbeit erstmals mit quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR). Die Auswahl der Oligonukleotid-Paare in Kombination mit einer TaqMan Sonde erfolgte wie in Kapitel 2.3.4.1 beschrieben. Nach anfänglichen Optimierungsexperimenten konnte schließlich ein auf 25 µl reduzierter Standard RT-PCR Ansatz eingesetzt und mit einem Standard RT-PCR-Profil für alle Versuche angewendet werden (Kapitel 2.3.4.1). Eine absolute Quantifizierung, d.h. die Bestimmung der Molekülzahl des zu untersuchenden Transkripts in der Gesamt-RNA, ist nur durch Erstellung einer Standardreihe mit seriellen Verdünnungen des *in vitro*-Transkriptes möglich. Abbildung 3.1 zeigt eine repräsentative Darstellung einer solchen quantitativen RT-PCR.

A



B

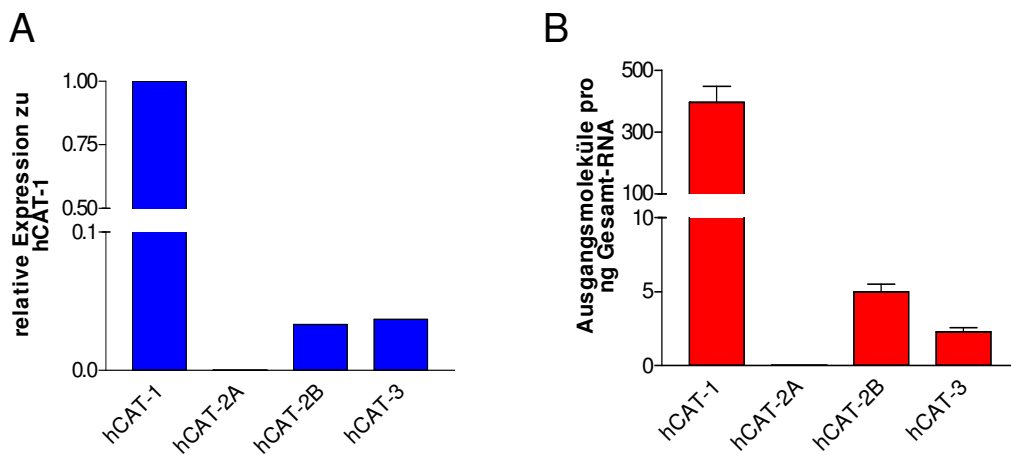


**Abbildung 3.1: Repräsentative Darstellungen einer *One-step* quantitativen *real time* RT-PCR (qRT-PCR) eines 94 bp großen Fragments des humanen CAT-2A (A) sowie eines 81 bp großen Fragments des humanen CAT-2B (B).** RT-PCR-Reaktionen einer 1:10 Verdünnungsreihe von 1ng bis 10fg synthetisierten *in vitro*-Transkripten der Transporter in Duplikaten. Die Herstellung der *in vitro*-Transkripte sowie die Quantifizierung ist ausführlich in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Die Reaktionen erfolgten in einem Standard qRT-PCR Ansatz in einem Endvolumen von 25 µl. Zur RT-PCR des

hCAT-2A wurden die Oligonukleotide HC2AB.1032ss und HC2A.1125as mit der FAM-markierten Sonde HC2A.Taq1 kombiniert, für hCAT-2 B die Primer HC2AB.1032ss und HC2B.1112as mit der FAM-markierten Sonde HC2B.Taq1. Alle quantitativen RT-PCR-Experimente erfolgten mit folgendem RT-PCR Profil: 30 min 50°C, 15 min 95°C 30 sec 95°C 30 sec 60°C (40 Zyklen) Die jeweils linke Abbildung zeigt die Amplifikations-Kurven der Verdünnungsreihe von links nach rechts beginnend mit der höchsten Konzentration. In der jeweiligen rechten Abbildung ist die dazugehörige Standardkurve dargestellt. Aufgetragen sind die Konzentrationen der eingesetzten RNA auf der x-Achse und die korrespondierenden  $C_T$ -Werte auf der y-Achse. Der Korrelations-Koeffizient beträgt bei beiden Reaktionen 1,000, Steigung bei hCAT-2A -3,310, was einer 100,5%-igen PCR-Effizienz entspricht, hCAT-2B zeigt eine Steigung von -3,343, mit einer daraus resultierenden PCR-Effizienz von 99,1%. Um verschiedene Amplifikate vergleichbar quantifizieren zu können, wurden die PCR-Effizienzen (E) außerdem nach der Formel  $E = [10^{-1/\text{Steigung}}] - 1$  (technical note no. LC11/2000; Roche Molecular Biochemicals) berechnet. Vergleichbare PCR-Bedingungen liegen vor, wenn  $\Delta E \leq 0,05$  ist. Dies konnte in den durchgeführten Experimenten erfüllt werden:  $\Delta E(\text{hCAT-2A: } -0,5012; \text{ hCAT-2B: } -0,4978) = 0,0034$ . Effizienzen aller verwendeten Amplifikate finden sich in Tabelle 9.2 im Anhang.

Hierzu wurden *in vitro*-Transkripte der Isoformen hCAT-2A und hCAT-2B von 1 ng bis 10 fg in einer 1:10 Verdünnung (was  $8,0521 \times 10^8$  bis  $8,0521 \times 10^3$  Molekülen des jeweiligen Transkripts entspricht) als Ausgangs-RNA amplifiziert. Die typische Amplifikationskurve stellt die zunehmende Fluoreszenz (aufgetragen auf der y-Achse) des freigesetzten Reporterfarbstoffes dar (siehe auch Abbildung 2.3). Die orange Linie kennzeichnet den Schwellenwert („Treshold“), der zur Bestimmung des  $C_T$ -Wertes dient: Der  $C_T$ -Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt. Trägt man den  $C_T$ -Wert gegen die korrespondierende Menge an eingesetzter RNA auf, erhält man eine entsprechende Gerade, aus der sich nun wiederum die zu bestimmenden unbekannt RNA-Mengen anhand den in den jeweiligen Diagrammen abgelesenen  $C_T$ -Werte berechnen lassen. Zeigt die Gerade eine Steigung von -3,322 ergibt sich daraus eine 100%-ige PCR-Effizienz (Tabelle 9.2 mit PCR-Effizienzen aller TaqMan-Sets siehe Anhang) Wie aus Abbildung 3.2 B erkennbar ist, enthalten EA.hy926 Zellen demnach  $397 \pm 50$  Moleküle hCAT-1,  $5 \pm 0,5$  hCAT-2B und  $2,2 \pm 0,3$  hCAT-3 pro ng Gesamt-RNA. hCAT-1 entspricht demnach etwa 0,5 pg pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA. Da schätzungsweise nur 5% der Gesamt-RNA aus mRNA besteht, würde demnach hCAT-1 etwa 0,01 ‰ der gesamten mRNA-Menge ausmachen. Vergleicht man die  $C_T$ -Werte von GAPDH (14,2) und hCAT-1 (25,6), so ist GAPDH in EA.hy926 Endothelzellen um den Faktor 1000 stärker exprimiert als hCAT-1.

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der mRNA-Expression ist die relative Auswertung verschiedener Transkripte im Verhältnis zu einem Haushaltsgen (z.B. GAPDH,  $\beta$ -Aktin) untereinander. Es ist dabei zu beachten, dass PCR-Reaktionen verschiedener Transkripte mit gleicher Effizienz ablaufen müssen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In den vorliegenden Untersuchungen ist diese Vergleichbarkeit bei allen erhaltenen Amplifikaten gegeben. Wie die relative Auswertung der hCAT-Isoformen in EA.hy926 Zellen in Abbildung 3.2 A zeigt, ist hCAT-1 der dominierende Transporter, hCAT-2B und hCAT-3 sind gering exprimiert, hCAT-2A konnte in keiner RNA nachgewiesen werden. Somit decken sich die Ergebnisse der absoluten und der relativen Quantifizierung der hCAT-Isoformen in EA.hy926 Zellen.



**Abbildung 3.2: Quantitative Auswertung der mit qRT-PCR untersuchten mRNA-Expression der hCAT-Isoformen 1, 2A, 2B und 3 in EA.hy926 Endothelzellen.** Für hCAT-2A konnte keine Expression in den Zellen nachgewiesen werden. Abbildung A zeigt die relativen Mengen der verschiedenen CAT-Isoformen. Nach den RT-PCR Reaktionen (Kapitel 2.3.4.1) der Transporter sowie des Haushaltsgens GAPDH (Oligonukleotide und TaqMan Sonden sind Kapitel 2.1.7 zu entnehmen) wurde zur Normalisierung der Daten der  $C_T$ -Wert des Haushaltsgens von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert ( $\Delta CT$ ). Nach der Festsetzung des Transporters CAT-1 als „Kontrollwert“ (K) wurde jeweils die Differenz der  $C_T$ -Werte zwischen diesem und den anderen Isoformen ( $P = \text{Probe}$ ) bestimmt ( $P_{\Delta CT-K_{\Delta CT}}$ ). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel  $2^{-(P_{\Delta CT-K_{\Delta CT}})}$  berechnet. Die  $C_T$ -Werte lagen durchschnittlich bei 25 (hCAT-1), 30 (hCAT-2B, hCAT-3) und 14 (GAPDH). Abbildung B zeigt zum Vergleich die absolute Quantifizierung der Ausgangsmoleküle pro ng Gesamt-RNA anhand der entsprechenden Standardreihen aus *in vitro* Transkripten (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=4-5$ ). Da in dieser Abbildung die entsprechenden GAPDH-Werte nicht berücksichtigt wurden, ergab sich eine etwas unterschiedliche Grafik.

Die Transporter  $y^+$ LAT1 und  $y^+$ LAT2 sind im Vergleich zu CAT-1 in EA.hy926 Zellen gleich stark respektive 10 fach schwächer exprimiert (Daten nicht gezeigt).

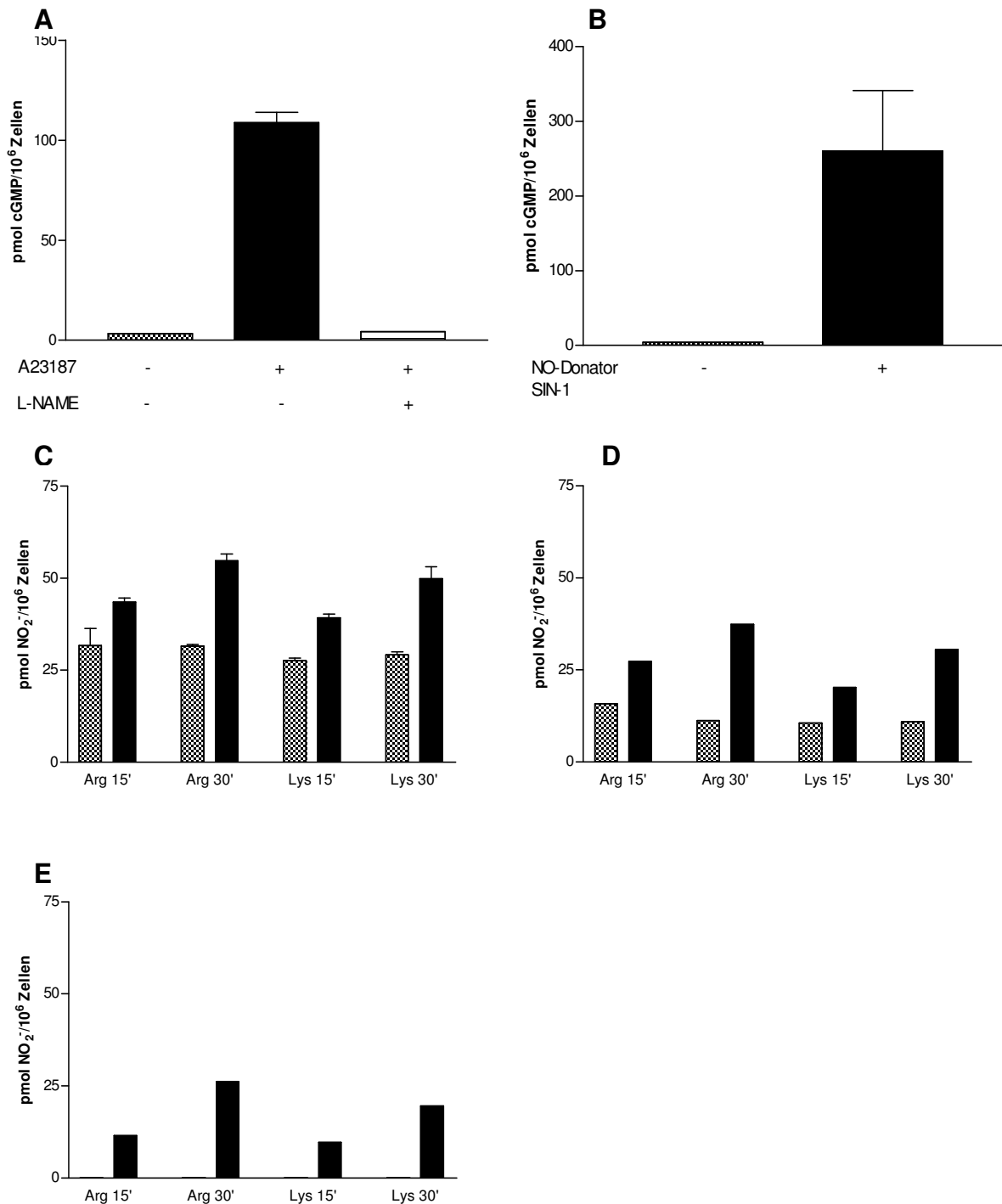
### 3.1.1.2 Vorversuche in EA.hy926 zur eNOS-Aktivität

In Vorversuchen sollte die Spezifität der Messung der eNOS-Aktivität verifiziert werden. Hierzu gehören die Calcium-Abhängigkeit der Reaktion, die Hemmung der NO-Synthese mit einem NOS-Inhibitor sowie der Einfluss von Superoxid-Dismutase auf die Halbwertszeit von NO. Die Messung der Aktivität von konstitutiven NO-Synthasen erfolgte standardmäßig mit dem RFL-6 Reporterzell-Assay, bei dem die lösliche Guanylat-Zyklase der RFL-6 Reporterzellen durch NO aktiviert wird und eine zur NO-Menge proportionale cGMP-Menge gebildet wird, die im RIA nachgewiesen werden kann. Da dieser Versuch sehr zeitaufwändig ist, wurde alternativ die Bestimmung von Nitrit/Nitrat aus NO mittels eines NO-Analyzers versucht.

#### 3.1.1.2.1 Spezifität der NO-Messung

In Abbildung 3.3 A ist erkennbar, dass die im RFL-6 Reporterzell-Assay gemessene NO-Produktion in EA.hy926 Zellen sowohl Calcium-sensitiv als auch mit dem NOS-Inhibitor L-NAME hemmbar war. Bei Zugabe des Calcium-Ionophors A23187 wurde ein Calcium-Influx in die Zelle bewirkt und somit das Calcium-abhängige Enzym aktiviert: Die cGMP-Ausbeute steigt um das 35-fache. Ebenso kann mit dem für alle NOS-Isoformen wirksamen Inhibitor L-NAME die NO-Produktion auf basale Werte reduziert werden. Abbildung 3.3 B zeigt außerdem die maximale Stimulierbarkeit der löslichen Guanylatzyklase der RFL-6 Reporterzellen mit dem NO-Donator SIN-1. Wie aus den Abbildungen 3.3 C bis E sichtbar wird, ist die Messung des Nitrit-Gehaltes mit Hilfe des NO-Analyzers weitaus weniger geeignet. Es zeigt sich die schlechte Calcium-Stimulierbarkeit sowie die überaus hohen Basalwerte dieser Methode. Prinzipiell war zwar eine Verdoppelung des Nitrit-Gehaltes nach Verdoppelung der Zeit messbar, aufgrund der geringen Sensitivität, den längeren Inkubationszeiten und der hohen Störanfälligkeit wegen schwankenden Basalwerten war diese Methode jedoch für unsere Fragestellung ungeeignet.



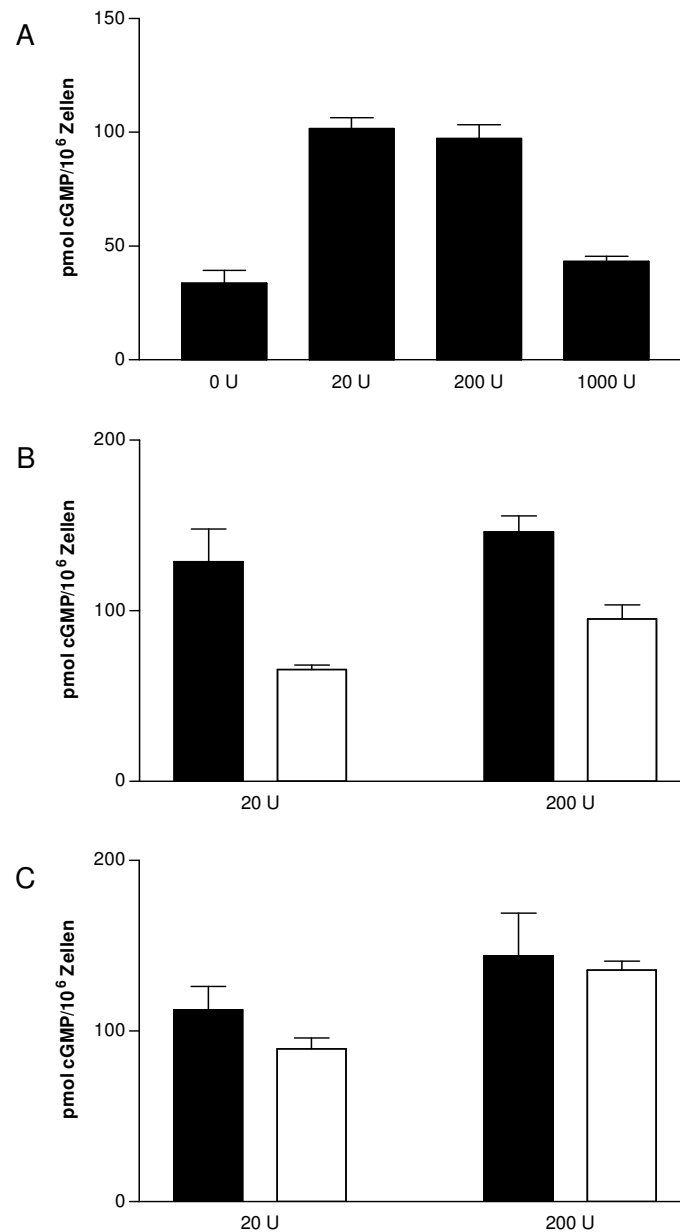


**Abbildung 3.3: Calcium-Abhängigkeit und Hemmbarkeit der endothelialen NO-Produktion in EA.hy926 Zellen.** Abbildungen **A** und **B** zeigen RFL-6 Reporterzell-Assays (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten) von 2 Tage konfluenten EA.hy926 Zellen in 6-Loch Makroplatten. (**A**) Nach 30-minütiger Vorinkubation in 1 mM Arginin und 20 U/ml SOD wurden die zuvor 2 x mit Locke's Lösung (LL) gewaschenen Zellen der 2. und 3. Säule für 2 Minuten in Anwesenheit von 1 mM Arginin (2. Säule) bzw. 1 mM Lysin (3. Säule), 20 U/ml SOD und 0,3 mM IBMX mit 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 zur NO-Produktion stimuliert. Die Überstände wurden auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehalts der RFL-6 Zellen erfolgte im RIA. Die 1. Säule zeigt die gleiche Behandlung der

Endothelzellen mit Ausnahme der Stimulation durch A23187. In der 3. Säule wurde die NO-Produktion durch den Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME (0,1 mM) unterbunden. **(B)** Das Säulenpaar zeigt zum Vergleich die maximale Stimulierbarkeit der RFL-6 Reporterzellen nach 2-minütiger Inkubation in LL mit 20 U/ml SOD, 0,3 mM IBMX ohne bzw. in Anwesenheit von 1  $\mu$ M NO-Donator SIN-1 (linke bzw. rechte Säule). Die Abbildungen **C-E** zeigen Versuche der Nitritbestimmung mit Hilfe des NO-Analyzers aus 2 Tage konfluenten EA.hy926 Zellen in 6-Loch Makroplatten (Kapitel 2.4.2.4). **(C)** 15 sowie 30 Minuten Inkubation der Endothelzellen in 1 mM Arginin bzw. Lysin wie angegeben. Die schraffierten Säulen zeigen jeweils die Inkubation ohne den Calcium-Ionophor A23187, die Zellen der schwarzen Säulen wurden mit 10  $\mu$ M A23187 15 bzw. 30 Minuten zur NO-Produktion stimuliert. In **D** wurde der Nitritgehalt der Inkubationslösungen subtrahiert, Abbildung **E** zeigt die Nitritproduktion abzüglich des (nichtstimulierten) basalen Nitritgehalts der Endothelzellen (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten). Die Darstellung der Graphen soll die schlechte Stimulierbarkeit sowie die hohen Basalwerte dieser Methode im Vergleich zum RFL-6 Reporterzell-Assay hervorheben.

#### **3.1.1.2.2 SOD-Abhängigkeit der NO-Produktion**

Die NO-Messung unter optimaler Substratversorgung (1 mM Arginin, es wurden nur L-Aminosäuren verwendet) kann mit Zugabe von 20 oder 200 U des Sauerstoff-Radikalfängers SOD um jeweils das 3-fache gesteigert werden. Aus bisher noch nicht geklärter Ursache bewirkt der Einsatz von 1000 U SOD keine Steigerung der NO-Ausbeute, es werden vielmehr die gleichen Werte wie ohne Zugabe des Radikalfängers gemessen (Abb. 3.4 A). In den Experimenten der Abbildungen 3.4 B und C ist erkennbar, dass die NO-Messung unter Lysin-Inkubation (weiße Balken) und somit einer Substratdepletion im Vergleich zur optimalen Substratversorgung mit Arginin (schwarze Balken) sowohl nach 30 Minuten (B) als auch bei 120 Minuten (C) durch die höhere Gabe von 200 U SOD gesteigert werden. Im Folgenden wird im jeweiligen Experiment angegeben, welche SOD-Konzentration verwendet wurde (20 oder 200 U/ml).



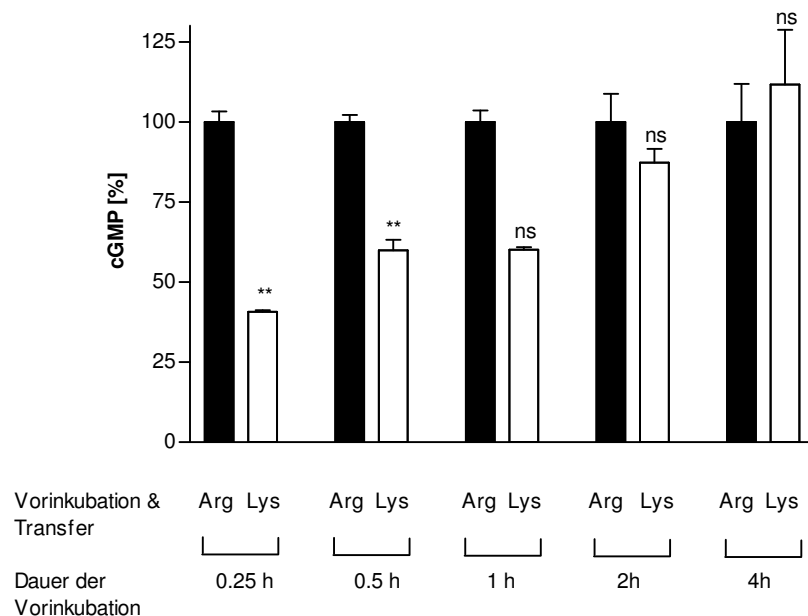
**Abbildung 3.4: Abhängigkeit der NO-Produktion in EA.hy926 Endothelzellen von der eingesetzten Menge Superoxid-Dismutase (SOD) (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Abbildung **A** zeigt die NO-Produktion nach 30-minütiger Vorinkubation in LL mit 1 mM Arginin und verschiedenen Konzentrationen SOD: 0, 20, 200 und 1000 U/ml. Nach der 2-minütigen Stimulation in den gleichen Lösungen mit 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 und 0,3 mM IBMX wurde der Überstand auf RFL-6 Reporterzellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Bestimmung des cGMP-Gehalts erfolgte im RIA (Kapitel 2.4.2.3). Die prinzipielle Versuchsdurchführung in Abbildung **B** erfolgte wie in **A**, allerdings mit dem Unterschied, dass nur die SOD-Konzentrationen 20 und 200 U/ml eingesetzt wurden und die Endothelzellen für 30 Minuten entweder in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß) inkubiert wurden. Abbildung **C** zeigt die NO-Produktion analog zu **B** nach 120-minütiger Inkubation in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß). (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Triplikaten).

### 3.1.1.3 Charakterisierung der ersten intrazellulären Arginin-Quelle: Recycling von Citrullin zu Arginin in EA.hy926

Vorherige Daten (Closs et al. 2000) haben gezeigt, dass die Aktivität der eNOS in EA.hy926 Endothelzellen nach 2-stündiger Inkubation in 1 mM Lysin nicht reduziert ist. Dies impliziert eine intrazelluläre Arginin-Quelle, die nicht mit dem Extrazellulärraum in Verbindung steht, die aber zugänglich ist für die eNOS. Eine mögliche Arginin-Quelle könnte das Recycling des bei der NO-Synthese entstehenden Citrullin zurück zu Arginin sein, das bereits in diversen Arbeiten beschreiben wurde (Übersicht: Solomonson et al., 2003).

#### 3.1.1.3.1 Zeitabhängige Regeneration der eNOS-Aktivität

In dieser Arbeit wurden die EA.hy926 Endothelzellen zunächst über kürzere Zeiträume hinweg in 1 mM Lysin inkubiert. Wie Abbildung 3.5 zeigt, konnte bei Inkubationszeiten von 0,25, 0,5 und 1 Stunde eine Reduktion der NO-Synthese beobachtet werden. Ab einer 2-stündigen Inkubationsdauer in 1 mM Lysin war diese Reduktion nicht mehr zu beobachten, die NO-Produktion war vergleichbar zu Arginin-inkubierten Zellen.

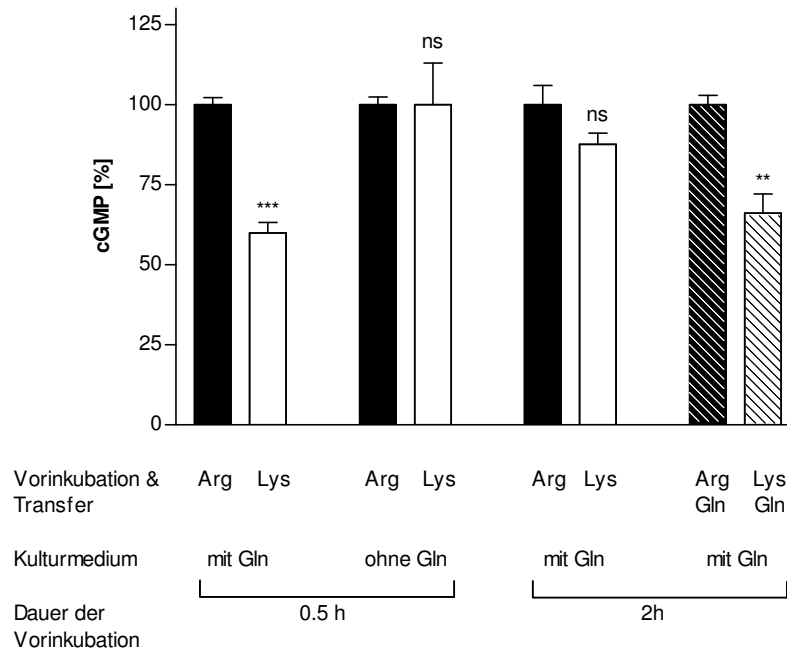


**Abbildung 3.5: eNOS-Aktivität in EA.hy926 Endothelzellen ist abhängig von der Vorinkubation in 1 mM Lysin (RFL-6 Reporterzell-Assay, n=3-6,).** Zwei Tage konfluente EA.hy926 Zellen in 6-Loch-Makroplatten wurden zweimal in LL gewaschen und für 0,25

bis 4 Stunden in LL mit 1 mM Arginin (schwarze Balken) oder 1 mM Lysin (weiße Balken) bei 37°C vorinkubiert. Zur NO-Messung wurden die Zellen 2 Minuten in der gleichen Lösung, die zusätzlich 0,3 mM IBMX, 200 U/ml SOD und 10 µM Calcium-Ionophor A23187 enthielt, inkubiert. Die Überstände wurden dann auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehalts der RFL-6 Zellen erfolgte im RIA. Ein basaler cGMP-Gehalt von  $6 \pm 0,5$  pmol/ $10^6$  Zellen wurde subtrahiert. Die Daten der Lysin-inkubierten Zellen sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $92 \pm 14$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 Einzelversuchen mit je 3 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *two-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,01, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

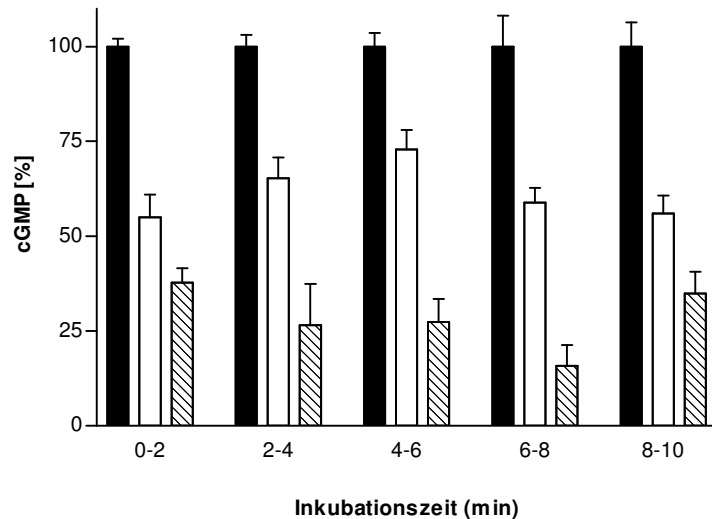
### 3.1.1.3.2 Glutamin induziert eine Hemmung der NO-Produktion

Die zeitabhängige Regeneration der NO-Synthese unter Inkubation in Lysin ließ vermuten, dass eine Komponente des Zellkulturmediums (die in ausreichend hohen Konzentrationen vorhanden ist und während des Experimentes entweder verbraucht oder ausgewaschen wird) für diese Unterschiede verantwortlich sein könnte. Da Glutamin die am höchsten konzentrierte Aminosäure im Zellkulturmedium ist und Glutamin bereits als Inhibitor der endothelialen NO-Synthese in verschiedenen Arbeiten (Hecker et al., 1990; Swierkosz et al., 1990; Sessa et al., 1990; Wu et al., 2001) beschrieben wurde, haben wir als nächstes getestet, ob die Substratdepletion in EA.hy926 Zellen von der Anwesenheit von Glutamin abhängig war. Abbildung 3.6 zeigt, dass keine Reduktion der eNOS-Aktivität nach 30-minütiger Lysin-Inkubation zu sehen ist, wenn die Zellen zuvor 2 Stunden in Glutamin-freiem Zellkultur-Medium gewachsen sind. Die Anwesenheit von Glutamin während der 120-minütigen Lysin-Inkubation verursachte ebenfalls eine Reduktion der NO-Synthese.



**Abbildung 3.6: Die Reduktion der eNOS-Aktivität ist nur bei Vorinkubation der EA.hy926 Zellen in Glutamin vorhanden (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Versuche wurden analog Abb. 3.5 durchgeführt. Die Vorinkubation in 1 mM Arginin (schwarze Balken) oder 1 mM Lysin (weiße Balken) alleine oder in Kombination mit 4 mM Glutamin (gestreifte Balken) erfolgte für 0,5 oder 2 Stunden bei 200 U SOD wie angegeben. Die Werte des zweiten Säulenpaars wurden aus Zellen erhalten, die vor dem Experiment 2 Stunden in Glutamin-freiem DMEM Medium inkubierten. Die Daten der Lysin-inkubierten Zellen sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $187,7 \pm 11,7$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 Einzelversuchen mit je 3 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *two-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,001 (\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,01, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

Eine 30-minütige Inkubation der Zellen in Lysin plus Glutamin verminderte die NO-Produktion weiter. Jedoch blieb die restliche eNOS-Aktivität in Lysin oder Lysin plus Glutamin inkubierten EA.hy926 Zellen über 5 aufeinander folgende Messungen konstant, was auf eine effektive Regeneration des verbleibenden Arginin-Pools schließen lässt (Abb. 3.7).

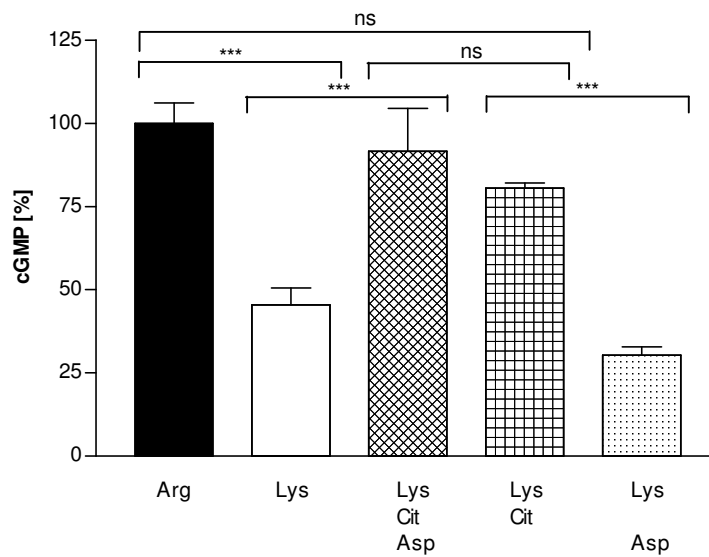


**Abbildung 3.7: Keine weitere Reduktion der eNOS-Aktivität in partiell depletierten EA.hy926 Zellen nach wiederholten Messungen (RFL-6 Reporterzell-Assay).**

EA.hy926 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit 1 mM Arginin (schwarze Balken), 1 mM Lysin (weiße Balken) oder 1 mM Lysin plus 4 mM Glutamin (gestreifte Balken) vorinkubiert. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.5 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die gleichen EA.hy926 Zellen 5 mal nacheinander zur NO-Produktion herangezogen wurden. Nach jedem Transfer wurde frische LL mit den entsprechenden Aminosäuren sowie 0,3 mM IBMX, 20 U/ml SOD und 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 auf die EA.hy926 Zellen gegeben und nach 2-minütiger Inkubation auf neue RFL-6 Zellen transferiert. Die Daten der Lysin- und Lysin-plus-Glutamin-inkubierten Zellen sind als Prozent der Werte der korrespondierenden in Arginin inkubierten Kontrollzellen errechnet (100% =  $35 \pm 2,5$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar.

### 3.1.1.3.3 Citrullin kann zurück zu Arginin regeneriert werden

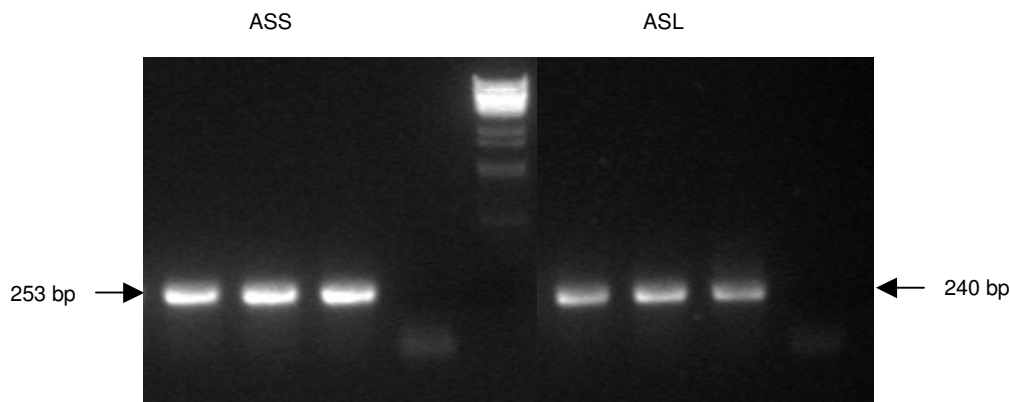
Die Reduktion der NO-Produktion nach 30-minütiger Inkubation in 1 mM Lysin konnte durch die Gabe von 4 mM Citrullin aufgehoben werden (Abbildung 3.8), was darauf schließen lässt, dass Citrullin nach Depletion des austauschbaren Arginins durch Lysin der limitierende Faktor ist. Somit scheint ein Teil des nicht-austauschbaren Arginin-Pool aus dem Recycling von Citrullin zu Arginin zu bestehen. Die Zugabe von Aspartat, der zweiten für das Recycling notwendigen Aminosäure, bewirkte keine Änderung in der eNOS-Aktivität.



**Abbildung 3.8: Citrullin kann die eNOS-Aktivität in partiell depletierten EA.hy926 Endothelzellen wiederherstellen (RFL-6 Reporterzell Assay).** EA.hy926 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Citrullin, 4 mM Aspartat. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.5 allerdings mit 200 U/ml SOD durchgeführt. Die Daten sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $94,37 \pm 4,5$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,001, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

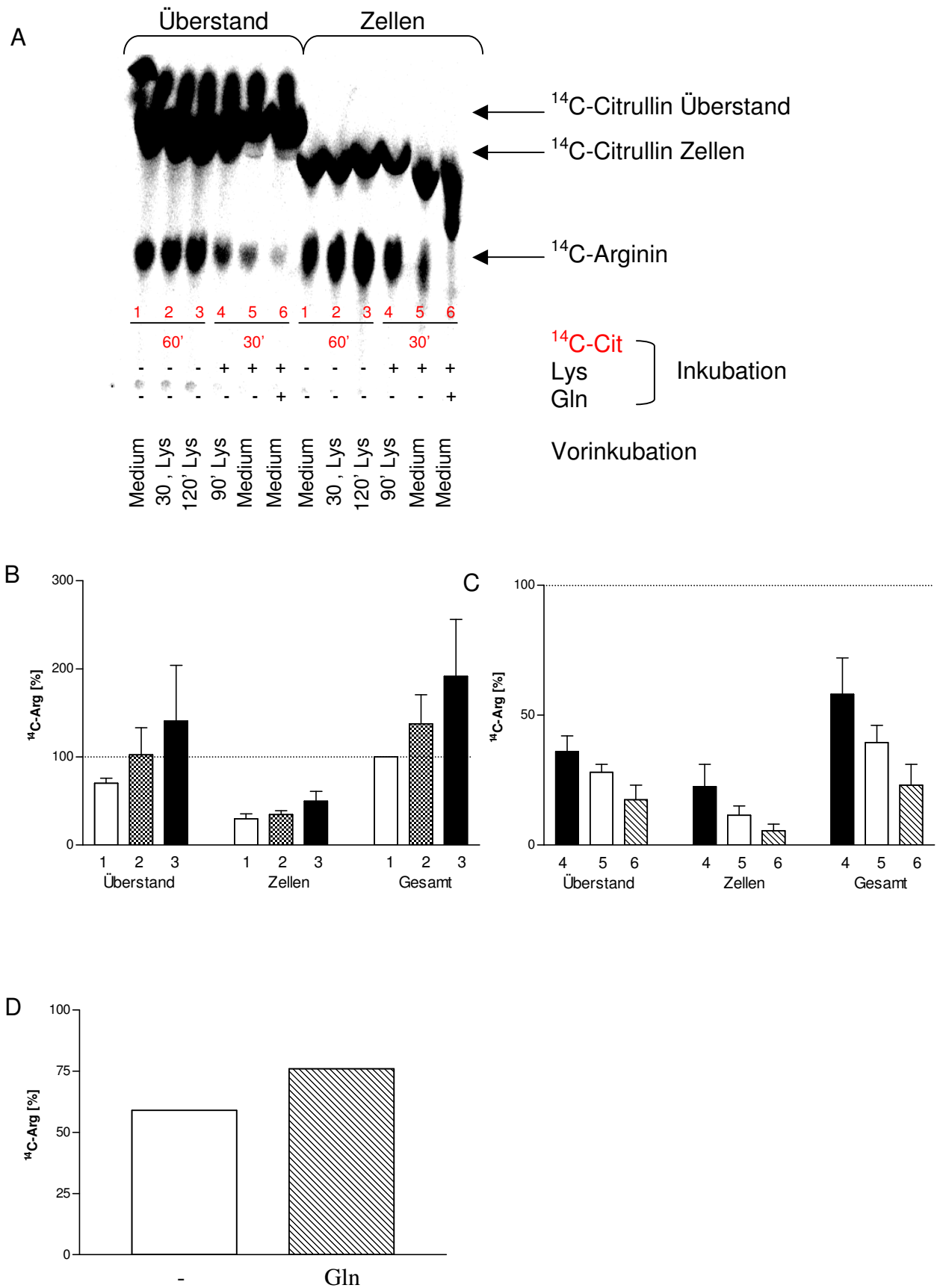


Die beiden für das „Recycling“ notwendigen Enzyme Argininosuccinat-Synthase (ASS) und –Lyase (ASL) konnten in EA.hy926 Zellen auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9: Expression der Recyclingenzyme Argininosuccinat-Synthase und –Lyase in EA.hy926 Zellen (RT-PCR).** Die RT-PCR-Amplifikation aus 0,5 µg Gesamt-RNA (Isolation siehe Kapitel 2.3.2.1) erfolgte jeweils mit den Oligonukleotid-Paaren hASS.1019ss/hASS.1272as für Argininosuccinat-Synthase (253 bp Amplikon) und hASL.266ss/hASL506as für Argininosuccinat-Lyase (240 bp Amplikon) nach dem Standard RT-PCR Ansatz (Kapitel 2.3.4). Das RT-PCR Profil (Kapitel 2.3.4) mit einer Zyklenzahl von 40 erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C.

Abbildung 3.10 zeigt in einer Dünnschichtchromatographie die Umwandlung von  $^{14}\text{C}$ -Citrullin in  $^{14}\text{C}$ -Arginin in intakten EA.hy926 Zellen. Bei der quantitativen Auswertung (Abb. 3.10 B und C) wird deutlich, dass bei längerer Vorinkubation der Zellen in 1 mM Lysin die Umwandlung von Citrullin zu Arginin gesteigert wird. Abbildung 3.10 C zeigt außerdem im Vergleich zu B, dass bei der Hälfte der Inkubationszeit auch nur etwa die Hälfte in Arginin umgewandelt wird. Generell ist zu beobachten, dass sich mehr Arginin im Überstand als in den Zellen befindet, bei steigender Inkubation in Lysin ist das vermehrte Arginin außerhalb der Zelle zu finden, was impliziert, dass das aus Citrullin generierte Arginin auch über Transportsysteme aus der Zelle gelangen kann. Die Zugabe von Glutamin reduziert die Umwandlung von Citrullin in Arginin in intakten Zellen, nicht aber im Zelllysate (Abbildung 3.10 D). Dies bedeutet, dass Glutamin keine direkte Hemmung der Recyclingenzyme Argininosuccinat-Synthase und –Lyase bewirkt, sondern dass diese Hemmung des Recyclings von der Intaktheit der Zellen abhängig ist.





**Abbildung 3.10: Konversion von  $^{14}\text{C}$ -Citrullin zu  $^{14}\text{C}$ -Arginin in EA.hy926 Zellen (Dünnschichtchromatographie).** Abbildung A zeigt ein repräsentatives Bild einer Auftrennung von  $^{14}\text{C}$ -Citrullin und  $^{14}\text{C}$ -Arginin mittels Dünnschichtchromatographie. Die

konfluenten Zellen wurden wie angegeben entweder direkt aus Medium oder nach 30-, 90- oder 120-minütiger Vorinkubation in 1 mM Lysin für 60 Minuten in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin (1-3) oder 30 Minuten  $^{14}\text{C}$ -Citrullin plus 1 mM Lysin (4,5) ohne oder mit 4 mM Glutamin (6) inkubiert. Es wurden zum einen der Überstand und zum anderen lysierte Zellen aufgetragen (siehe Kapitel 2.4.4.). Es ist zu beachten, dass in dieser Abbildung die 3fache Menge Zellysate im Vergleich zum Überstand aufgetragen wurde, dies wurde in der quantitativen Auswertung (Abb. B und C) berücksichtigt. Das unterschiedliche Laufverhalten des Citrullins von Überstand und Lysat resultiert wahrscheinlich aus einer Interaktion mit anderen Komponenten in Lysat und Überstand, die das Laufverhalten beeinflussen (siehe auch Abbildung 2.7). Die Auftragung erfolgte auf Kieselgelbeschichteten DC-Fertigplatten mit dem Laufmittel Chloroform : Methanol : Ammoniumhydroxid : Wasser (0,5 : 4,5 : 2,0 : 1,0). Abbildung **B** zeigt die quantitative Auswertung von 3-4 Einzelerperimenten nach 60-minütiger Inkubation in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin nach Vorinkubation in Medium (1, weiß), 30 min Lysin (2, kariert) und 120 min Lysin (3, schwarz). Abbildung **C** stellt die Auswertung aus 3 Einzelerperimenten nach 30-minütiger Inkubation in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin plus Lysin nach 90 min Vorinkubation in Lysin (4, schwarz) bzw. ohne Vorinkubation in Lysin (5, weiß) und die 30-minütige Inkubation in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin plus Lysin in Gegenwart von Glutamin (6, gestreift) -ebenfalls ohne Lysin-Vorinkubation- dar. 100% entsprechen dem insgesamt recycelten Arginin nach 60 Minuten Inkubation in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin ohne Vorinkubation in Lysin (1). Abbildung **D** repräsentiert einen Kontrollversuch, in dem die Konversion von  $^{14}\text{C}$ -Citrullin zu  $^{14}\text{C}$ -Arginin nicht in intakten Zellen, sondern im Zellysate gemessen wurde.

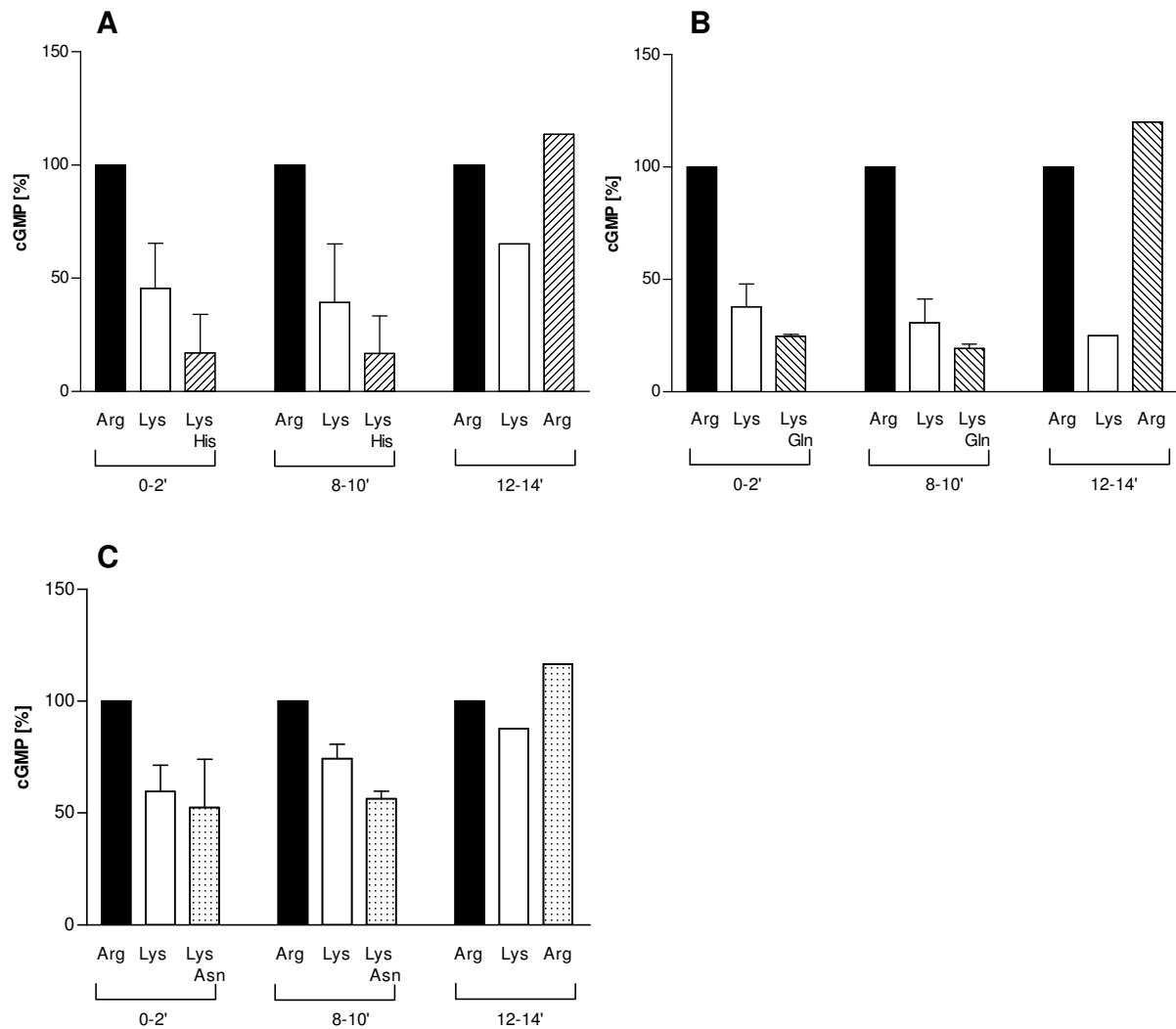
#### **3.1.1.3.4 Der Austausch von extrazellulärem Glutamin gegen intrazelluläres Citrullin wird vermutlich über den System N Transporter SN1 vermittelt**

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass Glutamin die NO-Produktion vermindert und Citrullin diese Reduktion wieder aufheben kann. Dies lässt vermuten, dass extrazelluläres Glutamin möglicherweise über einen Plasma-Membran-Transporter gegen intrazelluläres Citrullin ausgetauscht wird. Glutamin ist Substrat für eine Reihe von Aminosäure-Transport-Systemen, die durch Erkennung anderer neutraler und zum Teil auch kationischer Aminosäuren unterschieden werden können (z.B. die  $\text{Na}^+$ -abhängigen Systeme N, A,  $\text{B}^0$ ,  $\text{B}^{0,+}$  und  $\text{y}^+\text{L}$  sowie die  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Systeme L und  $\text{b}^{0,+}$ ; Übersicht: Bode BP, 2001; siehe auch Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Bekannte Glutamin-Transport-Systeme.** Natrium-unabhängige und -abhängige Systeme mit ihren zurzeit charakterisierten Isoformen. Angegeben sind die von ihnen transportierten Substrate, BAS: basische Aminosäuren, NAS: neutrale Aminosäuren. Einige Isoformen wurden mittels konventioneller RT-PCR auf ihre Expression in EA.hy926 Endothelzellen getestet (Kapitel 2.3.4, Oligonukleotidsequenzen Kapitel 2.1.7.1)

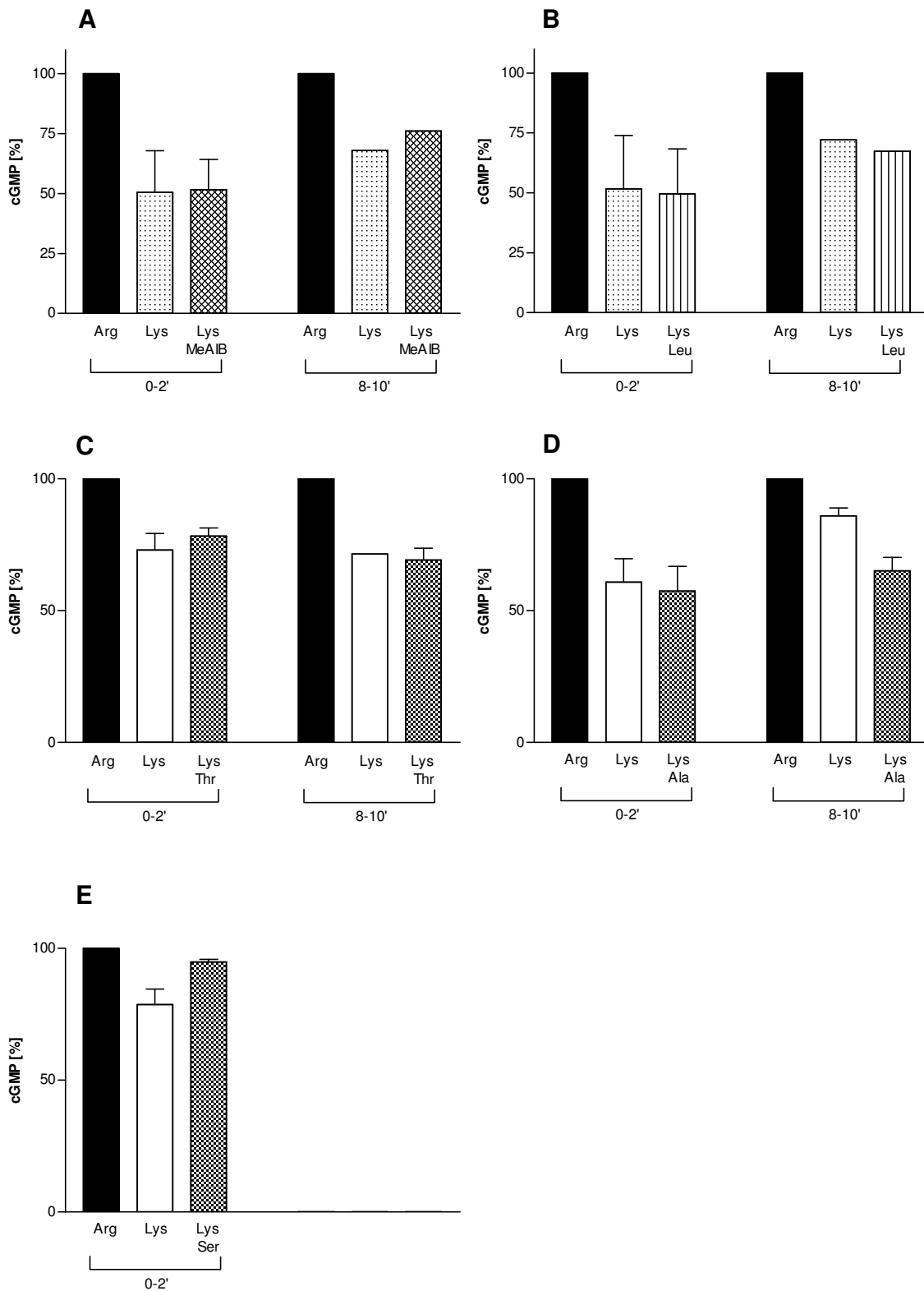
System	Isoform	Substrate	Na <sup>+</sup> - abh.	EA.hy926 RT-PCR
L	LAT1 LAT2	Gln, Leu, Ala, Ser Thr	-	Nicht getestet
b <sup>0,+</sup>	b <sup>0,+</sup> AT	Gln, Leu, alle anderen NAS + BAS	-	Keine Expression
y <sup>+</sup> L	y <sup>+</sup> LAT1 y <sup>+</sup> LAT2	Gln, Leu, Ala, Ser Thr + BAS	- +	
B <sup>0,+</sup>	ATB <sup>0,+</sup>	Gln, Leu, alle anderen NAS + BAS	+ +	Nicht getestet
ASC	ASCT1 ASCT2, ATB <sup>0</sup>	Ala, Ser, Cys, Thr Gln, Leu, Ala, Ser, Cys, Asn, Val, Met, Thr, Gly	+ +	Nicht getestet
B <sup>0</sup>	H4-ASCT2 B <sup>0</sup> AT	Gln, Ala, Ser, Cys, Asn NAS	+ +	Nicht getestet
A	SAT1/ATA1/GlnT SAT2/ATA2/SA1 SAT3/ATA3	Gln, Ala, Ser, His, Asn, Met, MeAIB Wie SAT1 + Pro, Gly Wie SAT1 + Pro, Cys, Thr, Lys	+ + +	Nicht getestet
N	SN1/SNAT3 SN2/SNAT5	Gln, His, Asn, Ala Gln, His, Asn, Gly, Ala, Ser	+ +	

Um herauszufinden, welches dieser Systeme in der Herunterregulation der eNOS-Aktivität beteiligt sein könnte, haben wir prototypische Substrate für jedes der in Frage kommenden Systeme auf eine inhibierende Wirkung der eNOS hin untersucht. Wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich ist, konnte außer Glutamin (Abb. 3.11 B) auch Histidin (4 mM) nach einer 30-minütigen Inkubation (Abb. 3.11 A) und mit einem etwas geringeren Effekt auch 20 mM Asparagin (Abb. 3.11 C) eine Reduktion der NO-Produktion in Lysin-inkubierten Zellen hervorrufen. Diese Reduktion blieb bei wiederholten Messungen bestehen und konnte durch eine dann folgende Inkubation in 1 mM Arginin vollständig aufgehoben werden.



**Abbildung 3.11: Ausschließlich Substrate des System N Transporters SN1 induzieren eine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 30 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell Assay).** EA.hy926 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Histidin, 4 mM Glutamin, 20 mM Asparagin. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.7 durchgeführt, eine anschließende 6. und 7. Inkubation zur NO-Produktion erfolgte statt in Lysin plus Histidin, Glutamin oder Asparagin in 1 mM Arginin. Die Daten sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $225,1 \pm 7,3$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar.

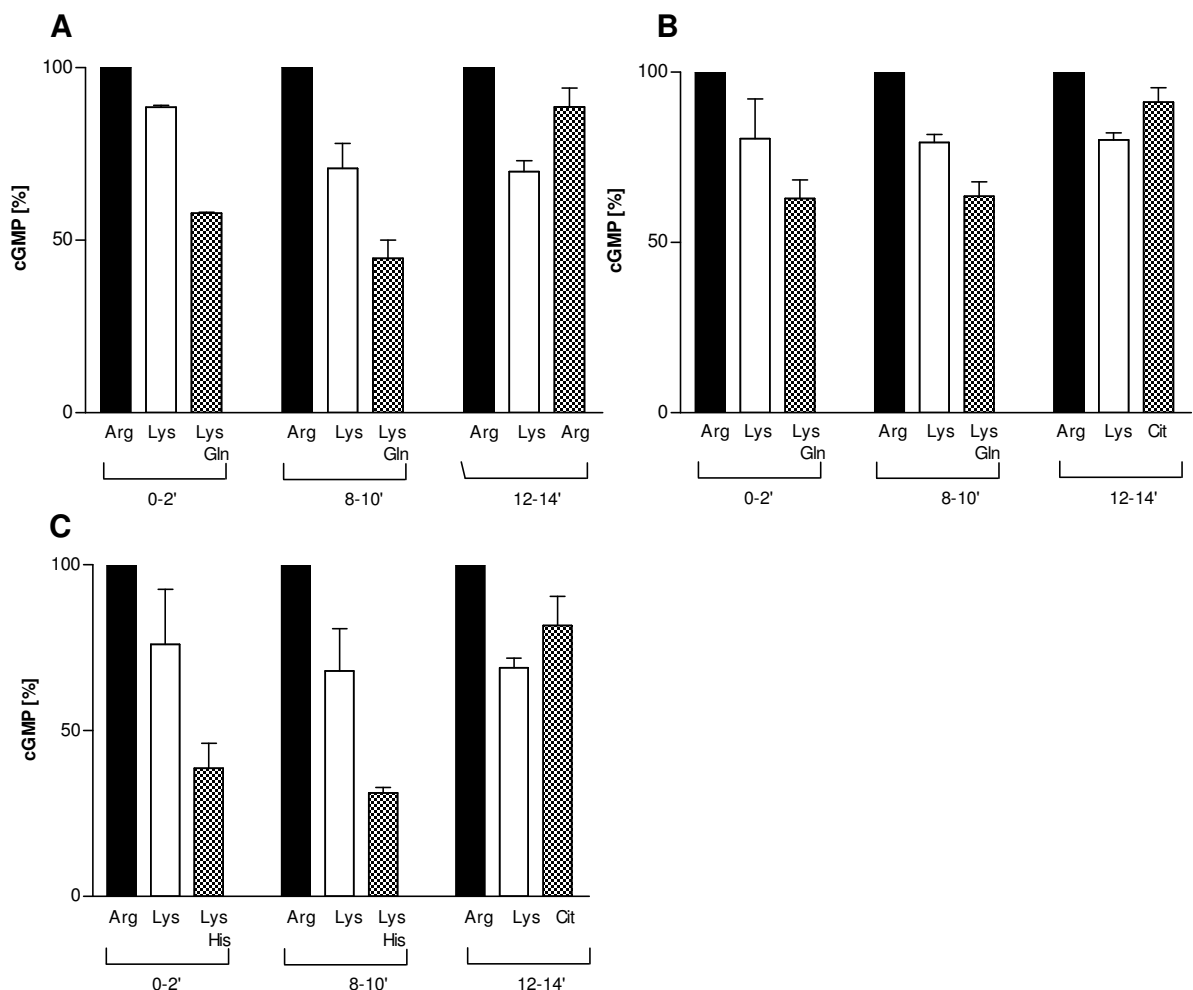
Eine 30-minütige Inkubation in 4 mM MeAIB (Abb. 3.12 A), dem Modells substrat für System A Transport, oder 4 mM Leucin (Abb. 3.12 B) bewirkt zusätzlich zur Lysin-Inkubation keine weitere Einschränkung der NO-Synthese. Auch die Aminosäuren Threonin, Alanin und Serin (alle 4 mM) konnten (z.T. durch wiederholte Inkubationen) keine Reduktion der NO-Synthese induzieren.



**Abbildung 3.12: Substrate anderer Transportsysteme induzieren keine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 30 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu Abbildung 3.11 mit 20 U SOD. Die EA.hy926 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM MeAIB, 4 mM Leucin,

4 mM Threonin, 4 mM Alanin, 4 mM Serin. Die Inkubation in 4 mM Serin wurde lediglich in einer 2-minütigen Inkubation getestet (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten, 100% =  $48,3 \pm 5,0$  pmol/ $10^6$  Zellen).

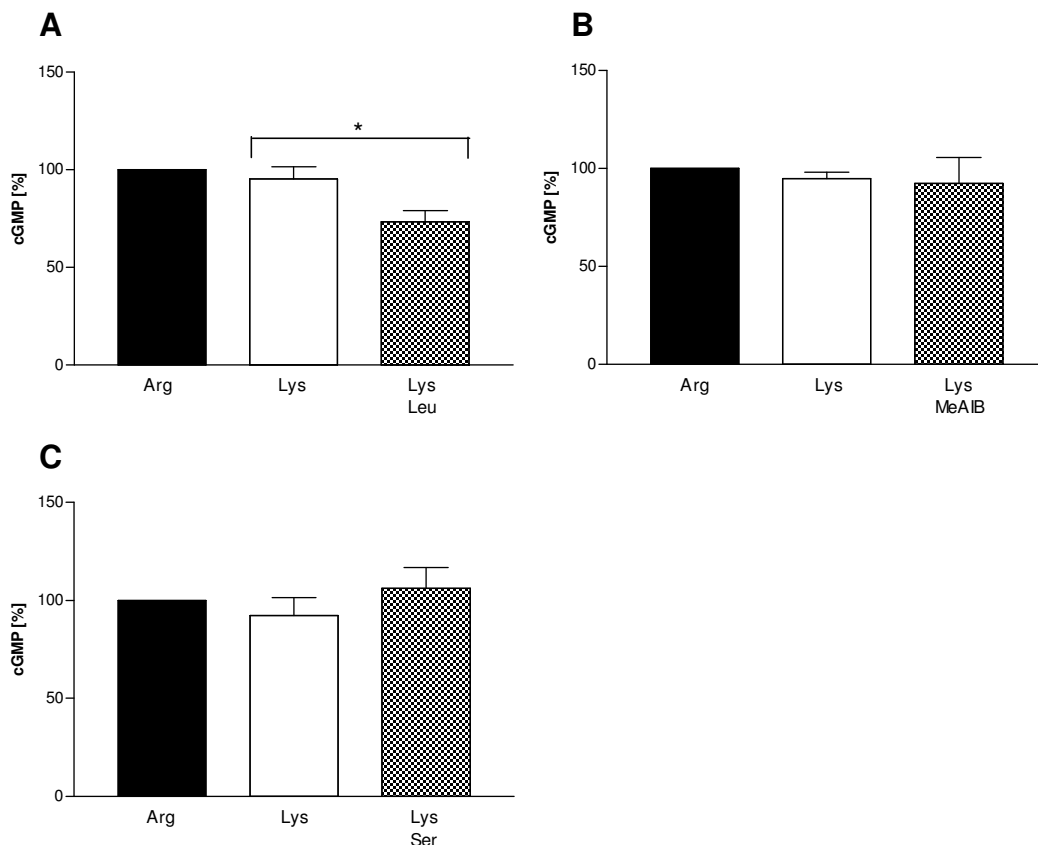
Die Reduktion der NO-Synthese nach 2-stündiger Inkubation in 4 mM Glutamin war auch hier bei Wiederholungen der Messung gleich bleibend und konnte in EA.hy926 Zellen nicht nur durch Arginin, sondern ebenfalls durch Citrullin wieder aufgehoben werden (Abb. 3.13 A, B). Der gleiche Effekt war ebenso nach wiederholter Histidin-Inkubation zu sehen (Abb. 3.13 C), auch dieser konnte durch Citrullin wieder aufgehoben werden. Die Versuche zur Aufhebung dieser Reduktion sind von Lars Plies durchgeführt worden.



**Abbildung 3.13: Substrate des System N Transporters SN1 induzieren eine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 120 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Abbildung A zeigt die NO-Produktion nach 120-minütiger Inkubation in 1 mM Arginin (schwarz), 1 mM Lysin (weiß) und 1 mM Lysin plus 4 mM Glutamin (kariert). Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 3.11 beschrieben (20 U SOD). In einer 6. und 7. Inkubation wurde in der 3. Säule Lysin plus Glutamin durch 1 mM Arginin

ersetzt. Abbildungen **B** und **C** zeigen den Versuch wie in **A** jedoch wurde die 6. und 7. Inkubation hier in 4 mM Citrullin durchgeführt. In Abbildung **C** wurde die NO-Produktion nach 120 Minuten Inkubation in 1 mM Lysin plus 4 mM Histidin anstelle von 4 mM Glutamin gemessen (Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten, 100% =  $80,13 \pm 6,6$  pmol/ $10^6$  Zellen).

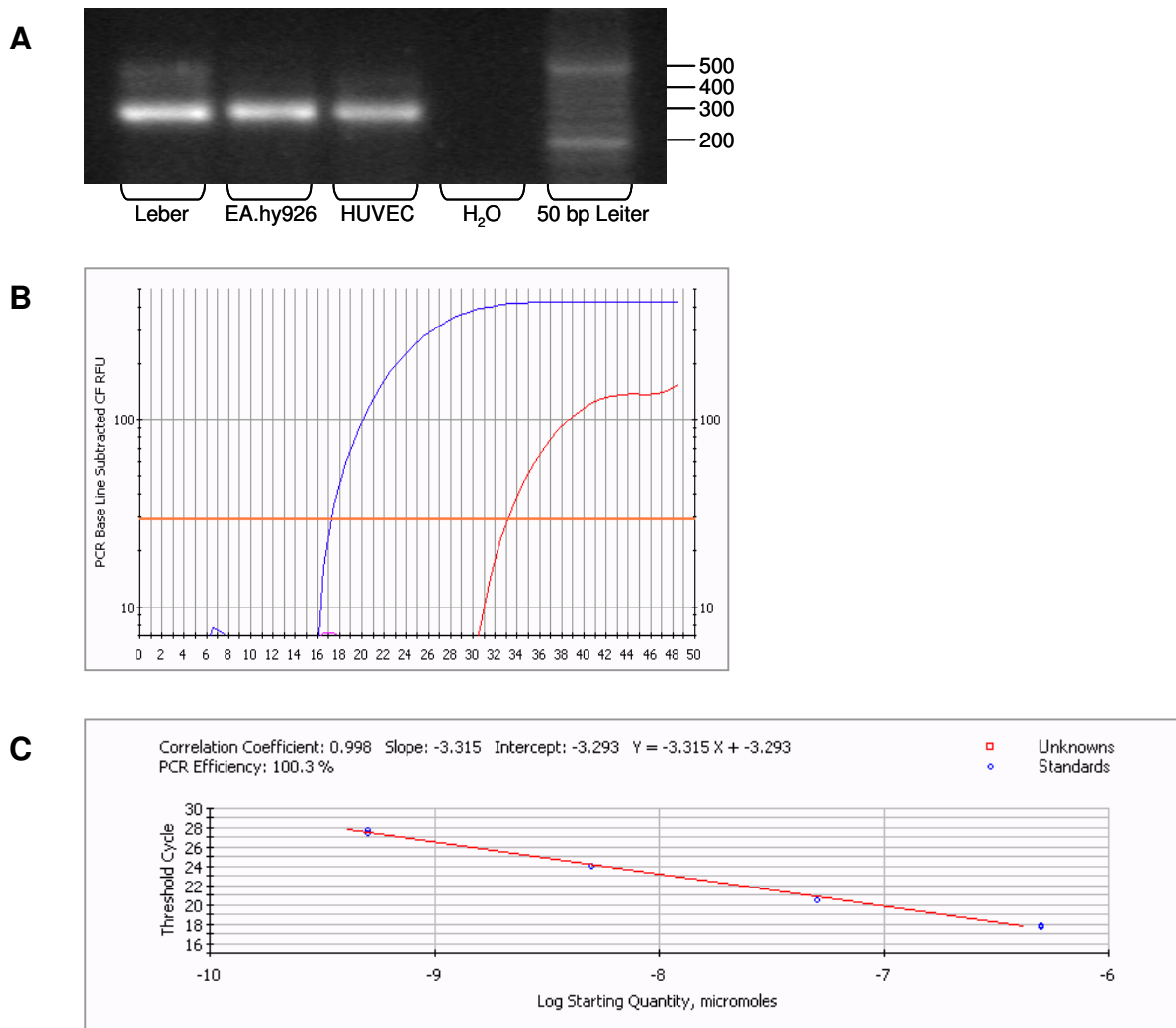
Auch eine 120-minütige Inkubation in MeAIB und Serin (alle 4 mM, Abbildung 3.14) hatte keinen Einfluss auf die Generation von NO. Die Reduktion der NO-Produktion nach 120 Minuten in Lysin plus Leucin zeigte sich als unspezifisch, da diese Reduktion auch in Kombination mit Arginin bestehen blieb.



**Abbildung 3.14: Substrate anderer Transportsysteme induzieren keine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 120 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 3.13 C beschrieben (20 U SOD). EA.hy926 Endothelzellen wurden für 120 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Leucin, 4 mM MeAIB, 4 mM Serin. (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten, 100% =  $228,06 \pm 30,19$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*) kennzeichnet P-Wert < 0,05.



Die Aminosäuren, die einen Einfluss auf die eNOS-Aktivität zeigten, passen zum Substratprofil des System N Transporters SN1 (vergleiche Tabelle 3.1). Initiale Experimente mittels konventionaler RT-PCR zeigten eine Expression von SN1 in EA.hy926 Zellen (Abbildung 3.15 A). Da bisher keine SN1-Expression in Endothelzellen beschrieben worden war, folgte die Untersuchung durch qRT-PCR. Leber-RNA wurde zur Kontrolle verwendet, da dieses Organ die höchste SN1-Expression zeigt. Eine Verdünnungsreihe mit daraus resultierender Standardreihe demonstriert die nahezu optimalen PCR-Bedingungen für den Nachweis von SN1-Transkripten (Abbildung 3.15 C): Bei Korrelation der eingesetzten Menge an Leber-RNA mit den Ct-Werten resultiert daraus eine 100%-ige PCR-Effizienz. Abbildung 3.15 B lässt den Schluss auf eine moderate SN1-Expression in EA.hy926 Zellen zu, diese beträgt etwa 0,01‰ im Vergleich zur extrem starken Expression des Transporters in der Leber. Im Verhältnis zu hCAT-1 ist der SN1 zu etwa 2‰ exprimiert.

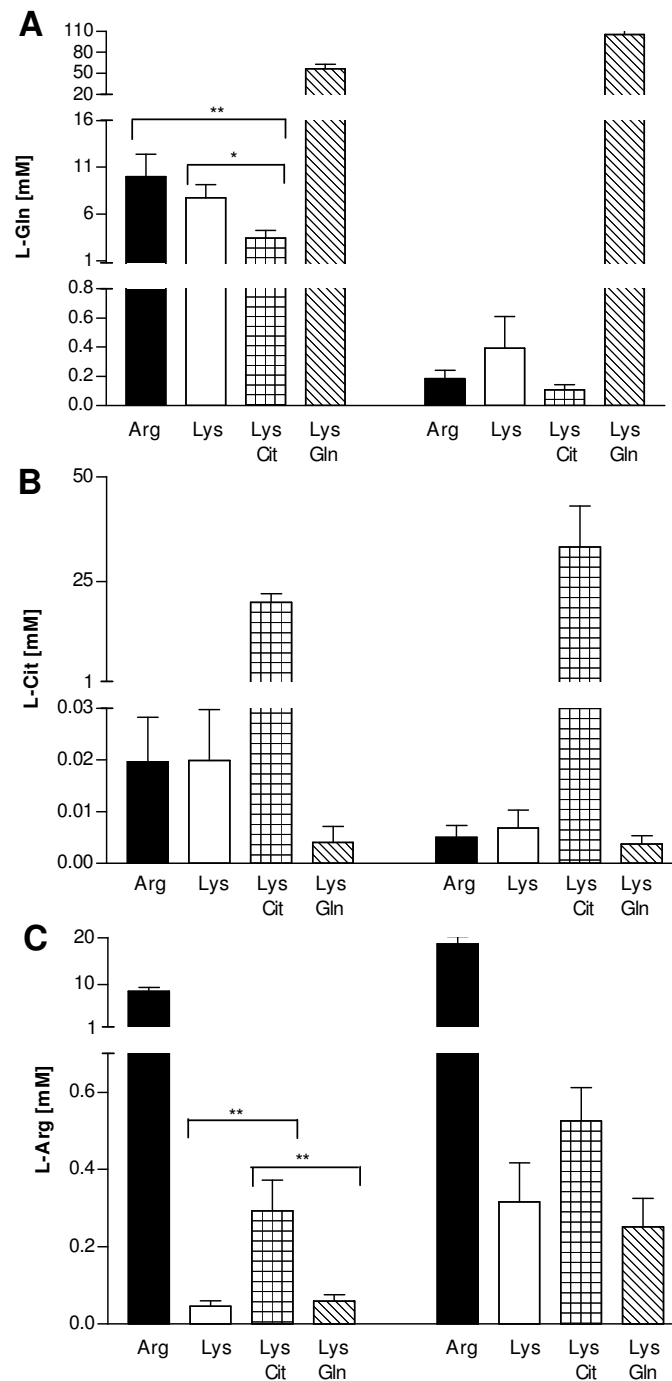


**Abbildung 3.15: Expression des System N Transporters SN1 in EA.hy926 Zellen.**

Abbildung **A** zeigt eine konventionelle RT-PCR-Amplifikation eines 297 bp großen Fragments aus dem codierenden Bereich von SN1 mit dem Oligonukleotid-Paar hSN1.1555ss/hSN1.1851as (Kapitel 2.1.7.1). Leber-RNA wurde als Positiv-Kontrolle mitgeführt, da der SN1 Transporter der bedeutendste Glutamin-Transporter in Hepatozyten ist. Der Standard RT-PCR Ansatz mit 0,5 µg Gesamt-RNA wurde nach dem Standard RT-PCR Profil mit 40 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt (Kapitel 2.3.4). In Abbildung **B** ist eine repräsentative Amplifikationskurve von Leber (blau, C<sub>T</sub> 16,4) und EA.hy926 (rot, C<sub>T</sub> 33) einer qRT-PCR aus je 0,5 µg Gesamt-RNA dargestellt (Kapitel 2.3.4.1). Abbildung **C** demonstriert anhand einer Verdünnungsreihe mit Leber RNA (0,5 µg bis 0,5 ng in 1:10 Verdünnungen in Duplikaten) die nahezu optimalen PCR-Bedingungen einer SN1-qRT-PCR mit einem Korrelationskoeffizient von 0,998, einer Steigung von -3,315 und der daraus resultierenden PCR-Effizienz von 100%.

Bisher ist Citrullin nicht als Substrat des System N Transporters SN1 beschrieben, aufgrund seiner Aminogruppe in der Seitenkette würde Citrullin aber in das Substratspektrum des Transporters passen. In Zusammenarbeit mit Stefan Bröer (Canberra, Australien) soll künftig getestet werden, ob Citrullin als Substrat in Frage kommt und ob der Transporter als Austauschere von Glutamin oder Histidin gegen Citrullin fungieren kann.

Um den Austausch von Citrullin gegen Glutamin zu zeigen, wurden die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen in Zellen gemessen, die entweder in Arginin oder Lysin alleine oder in Lysin in Kombination mit Citrullin oder Glutamin vorinkubiert worden waren (Abb. 3.16). Nach 30-minütiger Inkubation in Lysin plus Citrullin waren signifikant niedrigere Glutamin-Konzentrationen zu messen als bei Inkubation in Lysin alleine (Abb. 3.16 A). Gleichermaßen wiesen Zellen nach Vorinkubation in Lysin und Glutamin geringere Citrullin-Konzentrationen auf als Zellen, die in Lysin (oder Arginin) inkubierten (Abb. 3.16 B). Die Citrullin-Konzentrationen waren allerdings etwa 50fach geringer als die Glutamin-Konzentrationen und somit bereits am Detektionslimit. Zellen, die 30 Minuten in Lysin plus Citrullin inkubiert worden waren zeigten etwa 6fach höhere Arginin-Konzentrationen als Zellen, die in Lysin alleine oder Lysin plus Glutamin inkubiert worden waren (Abb. 3.16 C). Diese Daten stärken die Hypothese, dass Citrullin während der 30-minütigen Lysin-Inkubation der limitierende Faktor für die Arginin-Bereitstellung zur NO Produktion war und dass aus Citrullin generiertes Arginin nicht gegen extrazelluläres Lysin ausgetauscht werden kann.



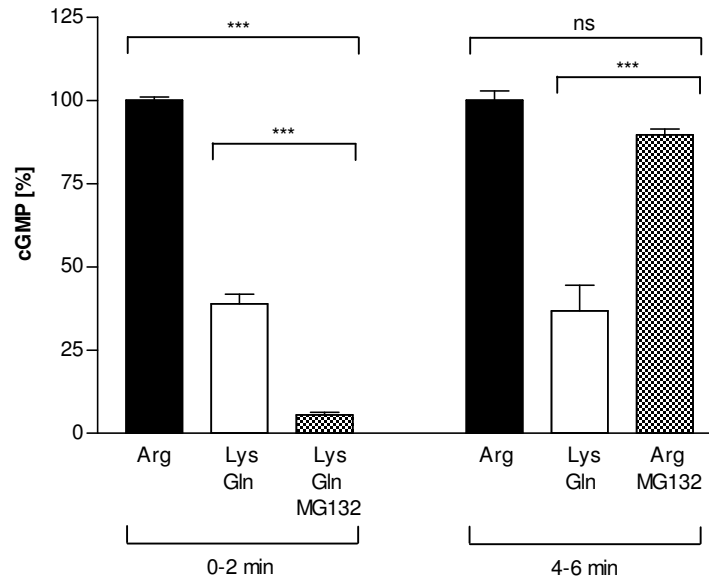
**Abbildung 3.16: Verhältnis zwischen extra- und intrazellulären Glutamin-, Citrullin- und Arginkonzentrationen in EA.hy926 Zellen (HPLC).** Zwei Tage konfluente EA.hy926 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit 1 mM den angegebenen Aminosäuren (Arginin schwarz, Lysin weiß, Lysin plus Citrullin kariert, Lysin plus Glutamin gestreift) inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal in eiskaltem PBS gewaschen und die Aminosäuren mit 70% Ethanol extrahiert. Die HPLC Analyse der angegebenen Aminosäuren (**A**: Glutamin, **B**: Citrullin, **C**: Arginin) wurde wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4-7 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,01, (\*) kennzeichnet P-Wert < 0,05.

#### **3.1.1.4 Charakterisierung der zweiten intrazellulären Arginin-Quelle: Proteinabbau in EA.hy926**

Sogar unter Bedingungen, bei denen das austauschbare Arginin durch extrazelluläres Lysin depletiert ist und das Recycling von Citrullin zu Arginin durch extrazelluläre Substrate des System N Transporters SN1 inhibiert ist, kann eine restliche NO-Produktion von 30-50% in EA.hy926 Zellen beobachtet werden. Außer dem Recycling von Citrullin ist kein anderer Biosyntheseweg von Arginin bekannt. Die einzige weitere Arginin-Quelle könnte demnach der Abbau von Proteinen sein. Proteine können sowohl durch das Proteasom, einem zellulären Multienzymkomplex, in Peptide gespalten werden, aber auch in spezifischen Organellen, den Lysosomen, degradiert werden. Die entstandenen Peptide werden von einer Peptidase in die einzelnen Aminosäuren gespalten. Das dabei freigesetzte Arginin könnte dann als Substrat für die eNOS verfügbar sein.

##### **3.1.1.4.1 Hemmung des Proteinabbaus führt zu einer Reduktion der eNOS-Aktivität unter Substratmangel**

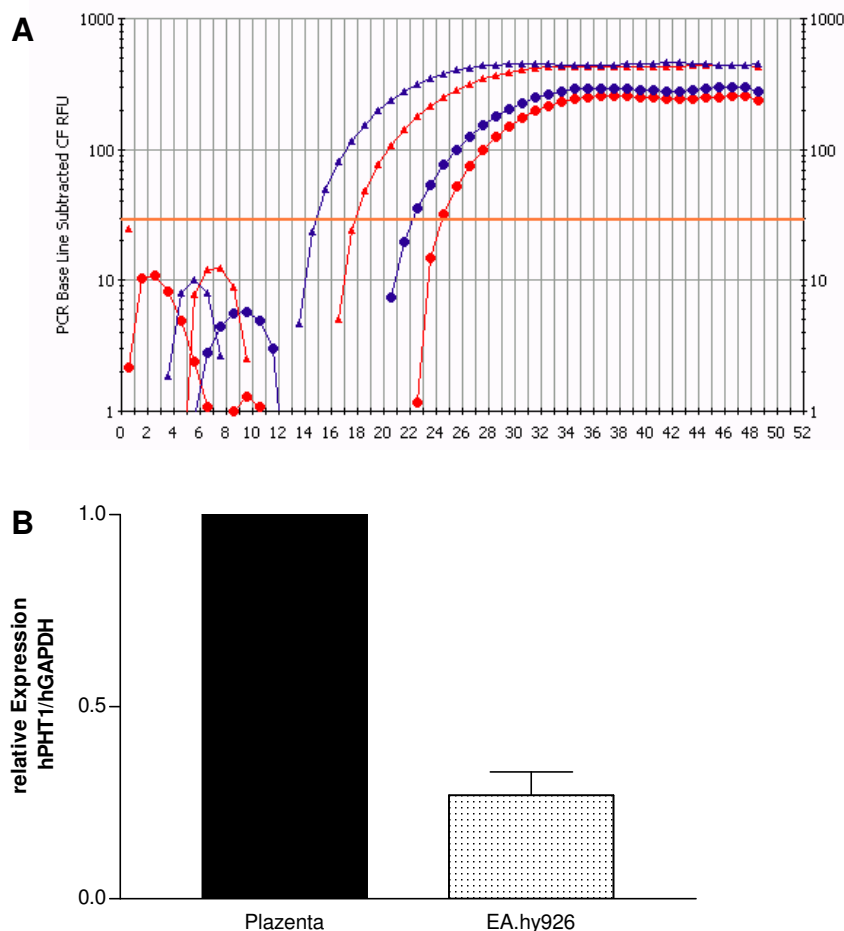
Tatsächlich war die restliche NOS-Aktivität nahezu vollständig gehemmt, wenn die Zellen in Lysin, Glutamin und dem so genannten Proteasominhibitor MG132 inkubiert wurden. Diese Hemmung konnte vollständig durch extrazelluläres Arginin aufgehoben werden (Abb. 3.17). Dieser Versuch ist geeignet, einen generellen Abbau von Proteinen zu verhindern. Er unterscheidet jedoch nicht zwischen proteasomalem oder lysosomalem Abbau, da die als Proteasominhibitor eingesetzte Substanz MG132 auch lysosomale Enzyme in ihrer Funktion beeinträchtigen kann. Sowohl im zweiten Teil dieser Arbeit (Substratversorgung der neuronalen NOS) als auch in der Promotionsarbeit von Susanne Karbach werden spezifischere Inhibitoren der beiden Abbauewege eingesetzt, um den Einfluss beider Abbauewege auf die Substratverfügbarkeit für NO-Synthasen zu differenzieren.



**Abbildung 3.17: eNOS Substrat-Depletion durch den Proteasominhibitor MG132 in EA.hy926 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay).** EA.hy926 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin (schwarz), 1 mM Lysin plus 4 mM Glutamin (weiß) oder 1 mM Lysin plus 4 mM Glutamin und 1  $\mu$ M Proteasom-Inhibitor MG132 (kariert). Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.5 durchgeführt, eine anschließende 2. und 3. Inkubation zur NO-Produktion erfolgte statt in Lysin plus Glutamin und MG132 in Arginin und dem Proteasominhibitor MG132. Die Daten sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $19,040 \pm 0,751$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,001, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

### 3.1.1.4.2 Einschränkung der aus Proteinabbau stammenden Substratquelle durch Depletion der Peptide

Die inhibierende Wirkung von Histidin auf die NO-Synthese könnte außer der Depletion von Citrullin und somit einer Einschränkung des Recyclings in einem weiteren Mechanismus begründet liegen: Durch extrazelluläres Histidin können intrazelluläre (argininhaltige) Peptide über den Peptid-Histidin-Transporter PHT1 aus der Zelle transportiert werden und somit nicht mehr als Arginin-Quelle verfügbar sein. Der Transporter hPHT1, der sowohl Histidin als auch Di- und Tripeptide als Substrate akzeptiert, ist in EA.hy926 Zellen exprimiert, wie die qRT-PCR in Abbildung 3.18 zeigt. Im Vergleich ist die Expression in Plazenta gezeigt, dem Gewebe, aus dem der humane Transporter kloniert wurde. Der zweite Transporter aus dieser Familie, PHT2, konnte in Endothelzellen nicht nachgewiesen werden. Experimente aus der Promotionsarbeit von Susanne Karbach zeigen außerdem, dass extrazelluläre, argininhaltige Dipeptide die Reduktion der NO-Synthese vollständig aufheben können und diese Aufhebung durch Histidin inhibierbar ist. Diese Daten stärken unsere Hypothese des Austausches von extrazellulärem Histidin gegen intrazelluläre Peptide, der für den Transporter PHT1 bisher nicht gezeigt worden war.



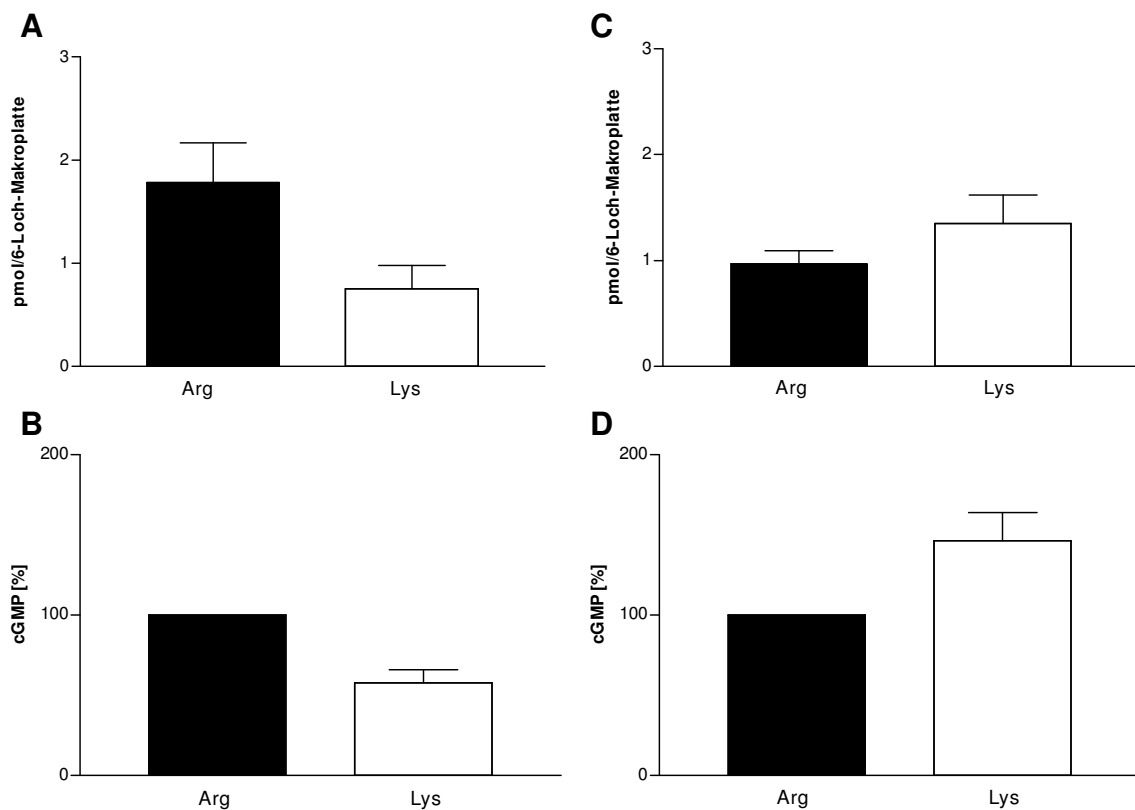
**Abbildung 3.18: Expression des Peptid/Histidin-Transporters PHT1 in EA.hy926 Zellen (qRT-PCR).** Abbildung **A** stellt je eine repräsentative Amplifikationskurve des PHT1 in Plazenta (rote Kreise,  $C_T$  24,4) und EA.hy926 (blaue Kreise,  $C_T$  22,1) dar. Die Standard RT-PCR-Ansätze mit je 0,5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit dem Standard RT-PCR-Profil mit 50 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt (Kapitel 2.3.4). Die Sequenzen der Oligonukleotide hPHT1.1444ss, hPHT1.1525as und hPHT1.Taq1 sind in Kapitel 2.1.7 aufgeführt. Zur Bestimmung der relativen Expression des Transporters in den Endothelzellen im Vergleich zur Positivkontrolle Plazenta, woraus der Transporter ursprünglich kloniert wurde, musste zusätzlich GAPDH als Haushaltsgen bestimmt werden (GAPDH.502ss, GAPDH.588as, hGAPDHTaq1). Die Berechnung der relativen Expression ist Abbildung 3.2 zu entnehmen. Durch die vermehrte Expression in EA.hy926 (blaue Dreiecke,  $C_T$  14,8) gegenüber Plazenta (rote Dreiecke,  $C_T$  17,8) ergab sich eine geringere, aber immer noch prominente Expression des PHT in EA.hy926 Endothelzellen (Abbildung **B**, Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=11).

Die Peptid-Transporter PepT1 und PepT2 konnten ebenfalls in EA.hy926 Endothelzellen mittels qRT-PCR detektiert werden, bei  $C_T$ -Werten von 28,9 respektive 25,7 für PepT1 und PepT2 lag die Expression allerdings um den Faktor 120 bzw. Faktor 10 unter der Expression von PHT1 (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.2 Substratversorgung der eNOS in primären Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC sind primäre Endothelzellen aus der Umbilikalvene von humanen Nabelschnüren. Sie exprimieren endogen die endotheliale NOS-Isoform, können aber nur kurzzeitig (bis zur 3. Passage) kultiviert werden (Galdal et al., 1984), da sie mit zunehmender Passagierung sehr schnell ihren Endothelzell-Charakter verlieren. Da diese Versuche sehr viel aufwendiger sind, wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich einige Schlüsselexperimente in HUVEC durchgeführt, um Daten aus der Endothelzelllinie EA.hy926 zu bestätigen.

In HUVEC konnte ebenso wie in EA.hy926 Zellen eine Reduktion der NO-Synthese um etwa 40% nach 30-minütiger Inkubation in 1 mM Lysin beobachtet werden (Abbildung 3.19 B). Die Inkubation der HUVEC's für 120 Minuten in Lysin hingegen resultierten ebenfalls in einer mit Arginin-inkubierten Zellen vergleichbaren NO-Produktion (3.19 C, D), d.h. keiner Reduktion der NO-Synthese und somit keiner Substratdepletion.



**Abbildung 3.19: eNOS-Aktivität in primären HUVEC Endothelzellen unterscheidet sich mit der Dauer der Vorinkubation in 1 mM Lysin (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Zwei Tage konfluente HUVEC in 6-Loch-Makroplatten wurden zweimal in LL gewaschen und für 0,5 (A) oder 2 Stunden (C) in 1 mM Arginin (schwarze Balken) oder 1 mM Lysin (weiße Balken) vorinkubiert. Die Versuche wurden anschließend wie in Abbildung 3.5



durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehalts erfolgte im RIA. Ein basaler cGMP-Gehalt der RFL-6 Zellen von  $2,339 \pm 0,712$  pmol/6-Loch-Makroplatte wurde subtrahiert. In den Abbildungen **B** und **D** sind die Daten der Lysin-inkubierten Zellen als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (**B**: 100% =  $1,784 \pm 0,386$ ; **C**:  $0,969 \pm 0,124$  pmol/6-Loch-Makroplatte). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 Einzelversuchen mit je 3 Einzelwerten dar.

Auffallend hingegen ist eine deutlich geringere absolute NO-Produktion der Primärzellen (1-2 pmol cGMP/6 Loch-Makroplatte, Abb. 3.19 A, C) gegenüber der permanenten Endothelzelllinie ( $\sim 90$  pmol cGMP/6 Loch-Makroplatte, Abb. 3.3 A), was aber aus der geringeren Zellzahl der HUVEC resultiert (die Proteinbestimmungen differierten um den Faktor  $\sim 20$ ). Daraus ergibt sich, dass die maximale Stimulierbarkeit der Primärzellen sich nicht so gravierend von der permanenten Zelllinie unterscheidet.

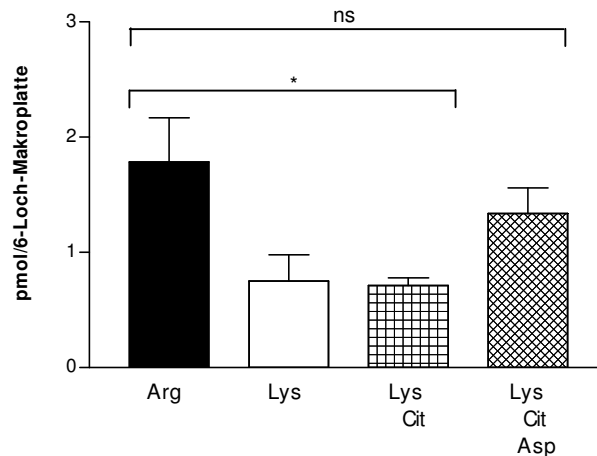
Der System  $\gamma^+$ -Transporter hCAT-1 wurde in HUVEC im Vergleich zu EA.hy926-Zellen etwa um den Faktor 25 stärker exprimiert ( $C_T$  21,0 vs. 21,7). Bei den System  $\gamma^+$ L-Transporter  $hy^+$ LAT1 und  $hy^+$ LAT2 betrug die relative Expression gegenüber hCAT-1 0,7 respektive 0,2 (Daten nicht gezeigt).

### **3.1.2.1 Die Konversion von Citrullin zu Arginin stellt eine Arginin-Quelle in primären Endothelzellen dar**

Analog zu den Resultaten in EA.hy926 Zellen wurde in primären HUVECs vermutet, dass eine Konversion des bei der NO-Synthese generierten Citrullins zurück zu Arginin durch die Recycling-Enzyme ASS und ASL stattfinden könnte. Dazu wurde im Folgenden untersucht, ob primäre Endothelzellen recyceltes Arginin zur NO-Synthese nutzen können und ob die gleichen Einflussmöglichkeiten auf diesen Syntheseweg wie bei EA.hy926 Zellen vorhanden sind.

### 3.1.2.1.1 Citrullin kann nur in Kombination mit Aspartat zu Arginin recycelt werden

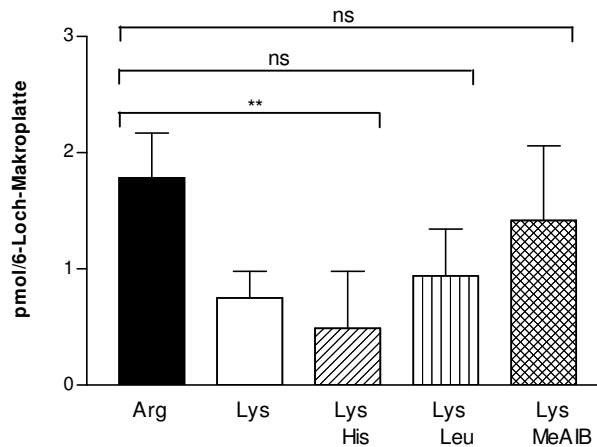
Die Reduktion der NO-Synthese unter Substratdepletion durch 30 Minuten Inkubation in Lysin konnte auch in HUVEC durch Citrullin, allerdings nur in Kombination mit Aspartat, der zweiten für das Recycling notwendigen Aminosäure, aufgehoben werden (Abb. 20).



**Abbildung 3.20: Citrullin kann die eNOS-Aktivität in partiell depletierten HUVEC Endothelzellen nur in Kombination mit Aspartat wiederherstellen (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Zwei Tage konfluente HUVEC in 6 Loch-Makroplatten wurden nach zweimaligem Waschen in LL für 30 Minuten in den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Citrullin, 4 mM Aspartat. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.5 durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*) kennzeichnet P-Wert  $< 0,05$ , *ns* kennzeichnet P-Werte  $> 0,05$ , die als nicht signifikant angesehen werden.

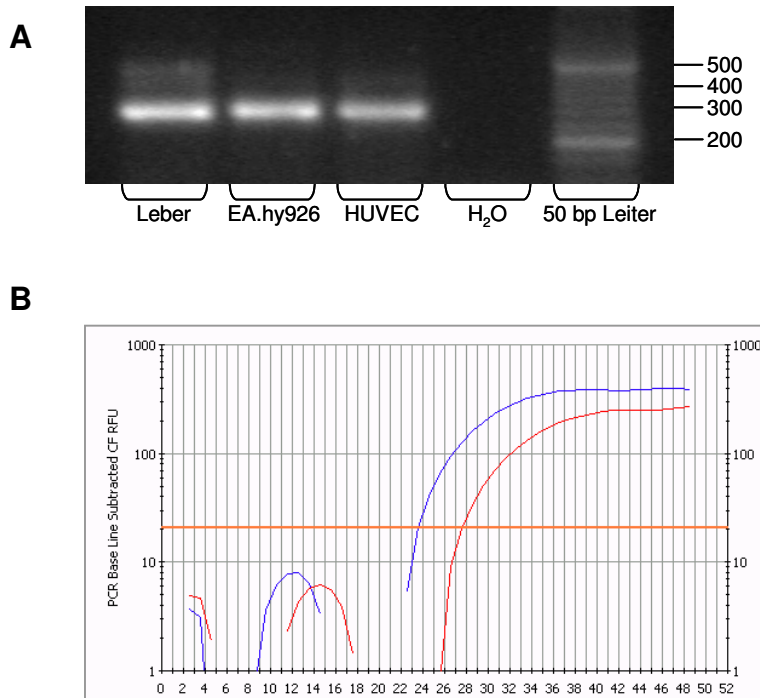
### 3.1.2.1.2 Histidin induziert in HUVEC eine Substratdepletion

Wie bereits in EA.hy926 Zellen beobachtet wurde, induziert Histidin, das sowohl Substrat des System N Transporters SN1 als auch das des Peptid-Histidin-Transporters PHT1 ist, nicht aber Leucin oder MeAIB, eine Reduktion der NO-Produktion in primären Endothelzellen (Abb. 3.21).



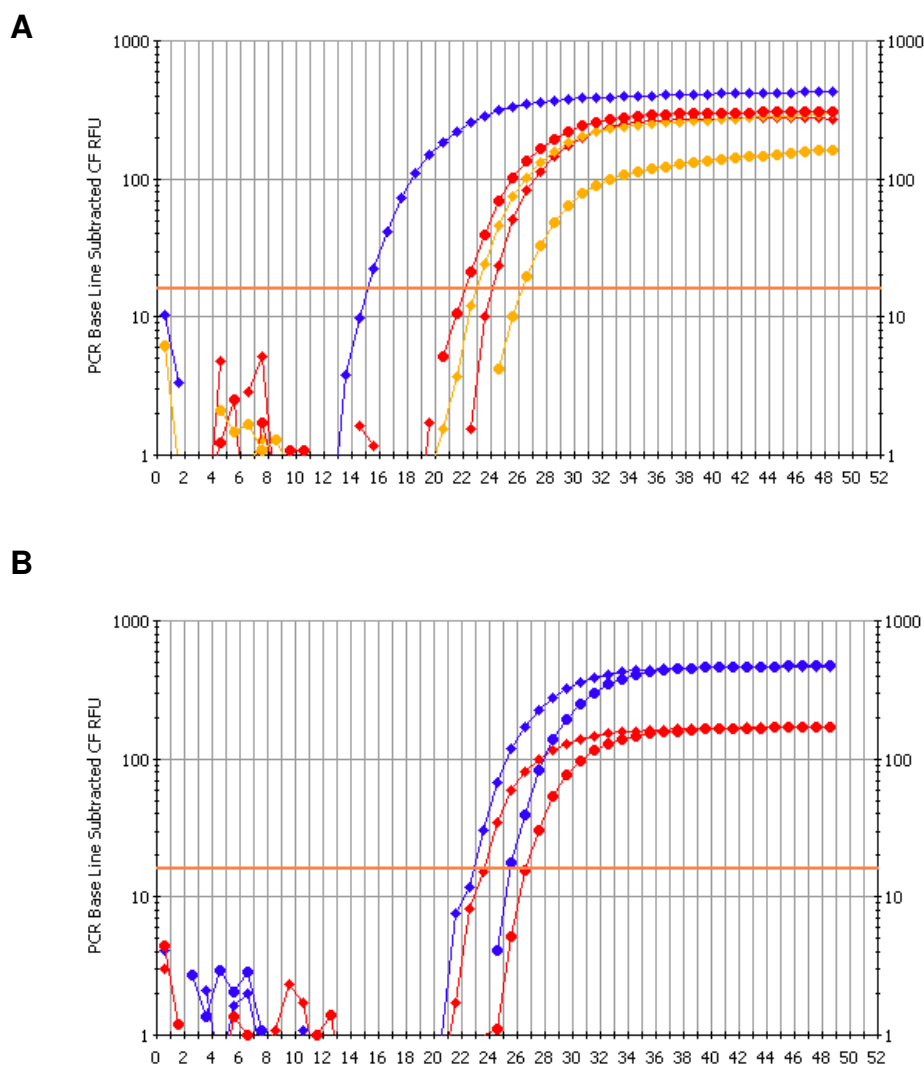
**Abbildung 3.21: Histidin, nicht aber Leucin oder MeAIB, induziert eine Substratdepletion in HUVEC nach 30-minütiger Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Zwei Tage konfluente HUVEC in 6 Loch-Makroplatten wurden zwei mal in LL gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Histidin, 4 mM Leucin, 4 mM MeAIB. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.5 durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,01, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

In qRT-PCR Experimenten konnte die Expression von SN1 nachgewiesen werden, der eventuell einen Histidin-Citrullin-Austausch bewirken könnte (Abb. 3.22). Die SN1-Expression in HUVEC war um etwa Faktor 30 stärker als in EA.hy926 Endothelzellen.



**Abbildung 3.22: Expression des System N Transporters SN1 in HUVEC.** Abbildung A zeigt eine konventionelle RT-PCR-Amplifikation eines 297 bp großen Fragments des SN1 aus Leber, EA.hy926 und HUVEC (Einzelheiten siehe Abb. 3.15 A). In Abbildung B ist eine repräsentative Amplifikationskurve von Leber (blau, aus 5 ng Gesamt-RNA, C<sub>T</sub> 23,5) und HUVEC (rot, aus 1 µg Gesamt-RNA, C<sub>T</sub> 27,6) einer qRT-PCR dargestellt. RT-PCR-Bedingungen und RT-PCR-Profil sind Kapitel 2.3.4 zu entnehmen. Die Demonstration der nahezu optimalen PCR-Bedingungen einer SN1-qRT-PCR sind in Abbildung 3.15 C ersichtlich.

Ob Proteinabbau ebenfalls eine Rolle spielt, muss durch den Einsatz von Proteinabbau-Inhibitoren im RFL-6 Reporterzell-Assay künftig getestet werden. Der Peptid-Histidin-Transporter PHT1 ist jedoch in HUVEC exprimiert (Abb. 3.23 A, rote Kreise): etwa doppelt so hoch im Vergleich zu EA.hy926 (0,785 vs. 0,304 gegenüber einer Kontrollexpression von 1,0 in Plazenta). Die Expression von PHT1 in Kombination mit der inhibierenden Wirkung von Histidin lässt die Vermutung zu, dass ebenso wie in der permanenten Endothelzelllinie Proteinabbau als Substratquelle in HUVEC eine Bedeutung haben könnte. Erstmals konnte in HUVEC auch der zweite Transporter dieser Familie PHT2 nachgewiesen werden (Abb. 3.23 A, orange Kreise), er wird im Vergleich zum PHT1 um den Faktor 50 schwächer exprimiert ( $C_T$  22,1 vs.  $C_T$  26,1).



**Abbildung 3.23: Expression verschiedener Peptid-Transporter in HUVEC (qRT-PCR).** Abbildung A stellt je eine repräsentative Amplifikationskurve des Peptid-Histidin-Transporter PHT1 in Plazenta (rote Karos  $C_T$  24) und HUVEC (rote Kreise,  $C_T$  22,1) sowie des PHT2 in Leber (orange Karos  $C_T$  22,9) und HUVEC (orange Kreise  $C_T$  26,1) dar. Die

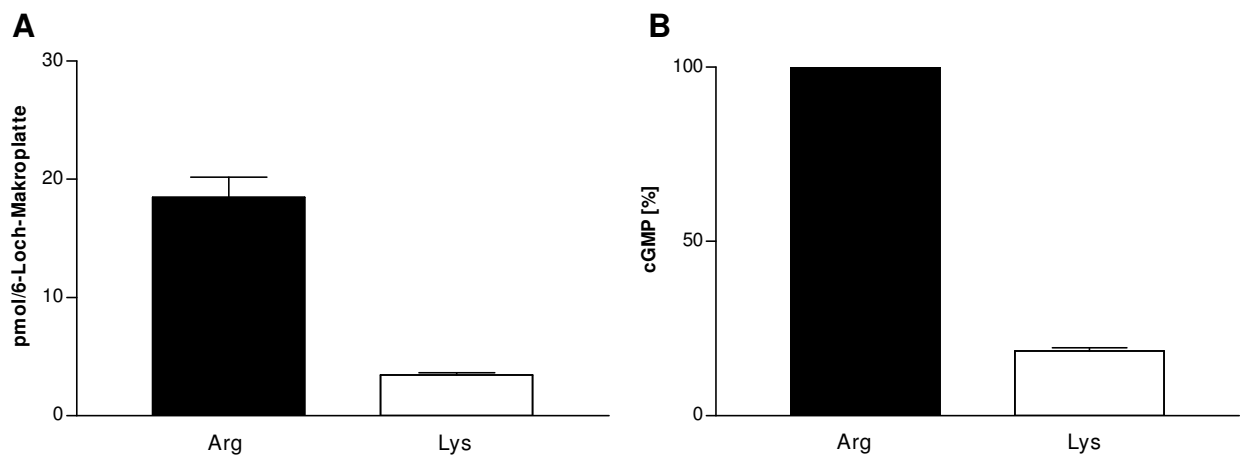
Standard RT-PCR-Ansätze mit je 0,5 µg Gesamt-RNA wurden mit dem Standard RT-PCR-Profil mit 50 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt (Kapitel 2.3.4). Die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.7 aufgeführt. Abbildung **B** stellt je eine repräsentative Amplifikationskurve des Peptid-Transporter PepT1 in Caco-2 (rote Karos  $C_T$  23,6) und HUVEC (rote Kreise,  $C_T$  26,6) sowie des PepT2 in Niere (blaue Karos  $C_T$  22,8) und HUVEC (blaue Kreise  $C_T$  25,4) dar.

Die Peptid-Transporter PepT1 und PepT2 konnten ebenfalls in HUVEC mittels qRT-PCR detektiert werden (Abb. 3.23 B), bei  $C_T$ -Werten von 26,6 (rote Kreise) respektive 25,4 (blaue Kreise) für PepT1 und PepT2 lag die Expression um den Faktor 50 bzw. Faktor 10 unter der des PHT1 und somit vergleichbar mit PHT2. Zur Positiv-Kontrolle wurde für PepT1 RNA aus Caco-2 Zellen und für PepT-2 Nieren-RNA verwendet. Die PCR-Effizienzen der Reaktionen sind Tabelle 9.2 zu entnehmen.

### 3.1.3 Substratversorgung der transfizierten endothelialen NO-Synthase in ECV-304

ECV304 Zellen, ein Subtyp der Blasenkarzinomzelllinie T-24, besitzt keine endogene NOS-Aktivität (Sowa et al., 1999). Diese Zellen wurden von Ursula Martiné mit dem Konstrukt pcDNA3-bNOSIII stabil transfiziert. Das Konstrukt, in dem die bovine NOS III über EcoRI-Schnittstellen in den pcDNA3-Vektor einkloniert wurde, war von William Sessa zur Verfügung gestellt worden (Sessa et al. 1995). Zur Charakterisierung der eNOS in diesen nicht-endothelialen Zellen hat Lars Plies innerhalb unserer Arbeitsgruppe eine Promotionsarbeit in Zusammenarbeit mit mir durchgeführt. Daher beschränken sich die Ergebnisse zu diesem Thema in der vorliegenden Arbeit nur auf die von mir eigens durchgeführten Versuche, mit dem Verweis auf die weiteren Daten von Lars Plies.

Wie in Abbildung 2.24 zu erkennen ist, führt eine 30-minütige Inkubation der Zellen zu einer stärkeren Reduktion der NO-Synthese als in Endothelzellen (18% vs. 60% Restaktivität).



**Abbildung 3.24: eNOS-Aktivität in ECV 304 N-III-2 ist abhängig von der Argininverfügbarkeit (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Konfluente ECV N-III-2 Zellen wurden nach zweimaligem Waschen in LL für 30 Minuten in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß) vorinkubiert und anschließend eine NO-Messung analog zu Abb. 3.5 durchgeführt. Ein basaler cGMP-Gehalt von  $1,933 \pm 0,088$  wurde subtrahiert. **A** zeigt die absoluten cGMP-Werte in pmol/6 Loch-Makroplatte, in **B** sind die Daten als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin berechnet (100 % =  $18,484 \pm 1,708$  pmol/6 Loch-Makroplatte). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-6 Einzelversuchen in Duplikaten dar.

Die Expression von hCAT-1 in ECV-304 Zellen ist vergleichbar mit der in EA.hy920-Zellen. Die System y<sup>+</sup>L-Transporter y<sup>+</sup>LAT1 und y<sup>+</sup>LAT2 werden nicht exprimiert.

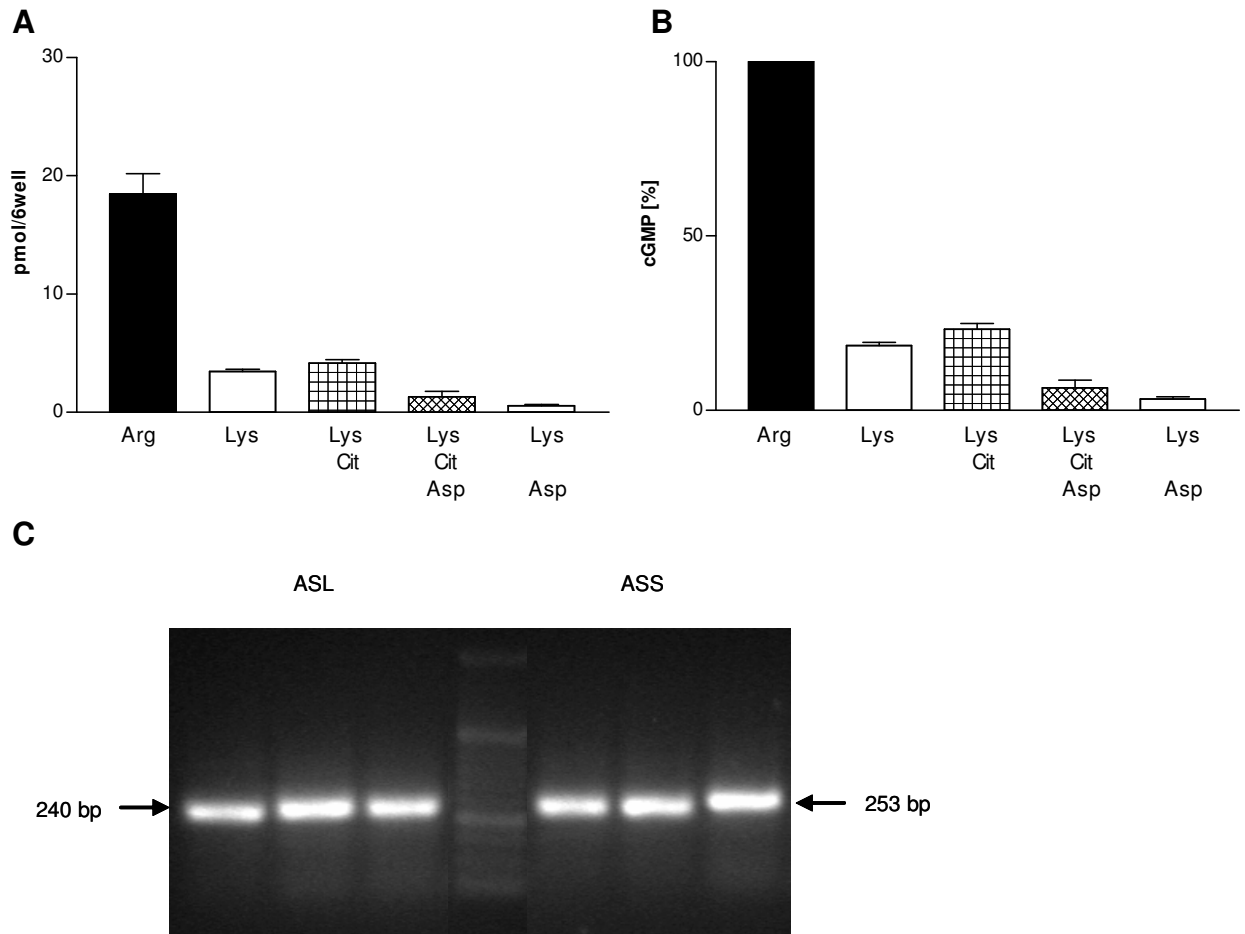
### **3.1.3.1 Existiert eine intrazelluläre Arginin-Quelle auch in ECV-304**

Zur Klärung der Frage, ob die Substratversorgung der eNOS aus Recycling (oder Proteinabbau) vom endothel-spezifischen Zelltyp abhängig ist, oder die endotheliale NOS Zelltyp-unabhängig aus dieser Quelle gespeist werden kann, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

#### **3.1.3.1.1 eNOS in ECV 403 Zellen ist abhängig von extrazellulärem Arginin**

Mit eNOS transfizierte ECV 304 Zellen waren nicht in der Lage, aus Citrullin generiertes Arginin zur NO-Synthese zu nutzen (Abb. 3.25). Auch die zusätzliche Inkubation in Citrullin plus Aspartat führte zu keiner Aufhebung der Reduktion (Abb. 3.25 A und B). Trotz dieser Ergebnisse konnten die Recyclingenzyme ASS und ASL auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 3.25 C) und Konversionsexperimente (Kapitel 2.4.4) von Lars Plies zeigten eine moderate Umwandlung (etwa 10% im Vergleich zu EA.hy926) von <sup>14</sup>C-Citrullin zu <sup>14</sup>C-Arginin. Der System N Transporter SN1 war in diesen Zellen nicht exprimiert.





**Abbildung 3.25: Citrullin kann die eNOS-Aktivität in partiell depletierten ECV 304 N-III-2-Zellen trotz Expression der Recyclingenzyme ASS und ASL nicht wiederherstellen (RFL-6 Reporterzell-Assay, RT-PCR).** Konfluente ECV N-III-2 Zellen wurden nach zweimaligem Waschen in LL für 30 Minuten in den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Citrullin, 4 mM Aspartat. Die anschließende NO-Messung wurde wie in Abb. 3.5 durchgeführt. Ein basaler cGMP-Gehalt von  $1,933 \pm 0,088$  wurde subtrahiert. **A** zeigt die absoluten cGMP-Werte in pmol/6 Loch-Makroplatte, in **B** sind die Daten als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin berechnet (100 % =  $18,484 \pm 1,708$  pmol/6 Loch-Makroplatte). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten dar. **Abbildung C** zeigt die RT-PCR-Amplifikation von ASS und ASL aus  $0,5 \mu\text{g}$  ECV 304 N-III-2 Gesamt-RNA (Kapitel 2.3.2.1) mit den Oligonukleotidpaaren hASS.1019ss/hASS.1272as für Argininosuccinat-Synthase (253 bp Amplikon) und hASL.266ss/hASL506as für Argininosuccinat-Lyase (240 bp Amplikon) nach dem Standard RT-PCR Ansatz (Kapitel 2.3.4). Das RT-PCR Profil (Kapitel 2.3.4) mit einer Zyklenzahl von 40 erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von  $60^\circ\text{C}$ .

## 3.2 Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase (nNOS)

Da in Endothelzellen zwei intrazelluläre Quellen (Proteinabbau und Citrullin-Regeneration) Arginin als Substrat für die eNOS zur Verfügung stellen können, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob dies auch bei neuronalen Zellen der Fall ist. Zur Untersuchung der Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase wurden zwei verschiedene nNOS exprimierende Zellen untersucht: A673 Neuroepitheliumzellen und TGW-nu-I Neuroblastomzellen.

### 3.2.1 Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase in A673

#### Neuroepitheliumzellen

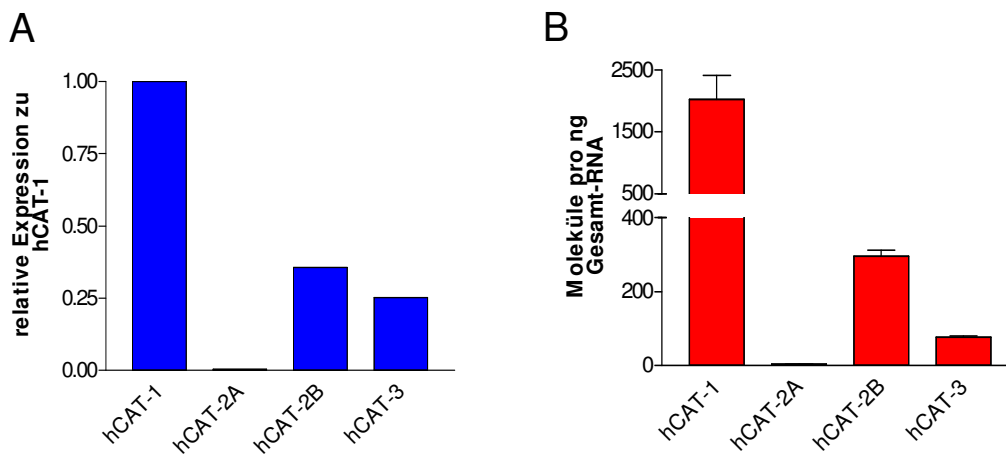
In einer anderen Arbeitsgruppe unseres Institutes wurden menschliche Zelllinien gesucht, die nNOS exprimieren, um sie als Modelle für nNOS-Expressionsregulation zu etablieren. Nach einem Screening von über 20 Zelllinien wurde unter anderem die Neuroepitheliumzelllinie A673 als geeignete menschliche Linie identifiziert, die eine signifikante nNOS-Expression zeigte (Boissel et al. 2000). Zur Untersuchung der Substratversorgung der neuronalen NOS haben wir zunächst die Neuroblastomzelllinie A673 ausgewählt und näher charakterisiert.

#### 3.2.1.1 Nachweis der Expression von hCAT mittels quantitativer real time RT-PCR (qRT-PCR)

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, konnte auch in neuronalen Zellen Arginin, das Substrat der nNOS, über kationische Aminosäure Transporter (CAT) im Austausch gegen Lysin der Zelle entzogen werden.

Die qRT-PCR-Experimente (Abb 3.26 B) zeigten, dass A673 Zellen  $2.030 \pm 380$  Moleküle hCAT-1,  $3,7 \pm 0,3$  hCAT-2A,  $296 \pm 16$  hCAT-2B und  $77 \pm 3$  hCAT-3 pro ng Gesamt-RNA enthielten. hCAT-1 entsprach demnach etwa 2 pg pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA. Ausgehend von der Annahme, dass schätzungsweise etwa 5% der Gesamt-RNA aus mRNA besteht, würde demnach hCAT-1 etwa 0,04 ‰ der gesamten mRNA-Menge ausmachen, das ist die vierfache Expression im Vergleich zu EA.hy926. Vergleich man die  $C_T$ -Werte von GAPDH (15) und hCAT-1 (23), so war GAPDH in A673 Neuroepitheliumzellen um etwa den Faktor 250 stärker exprimiert als hCAT-1. In A673 Zellen war der Transporter hCAT-2B ca. so stark exprimiert, wie in EA.hy926 hCAT-1. Das bedeutete, dass alle CAT-

Proteine in A673 Zellen weitaus stärker exprimiert waren als in den untersuchten Endothelzellen.



**Abbildung 3.26: Quantitative Auswertung der mit qRT-PCR untersuchten mRNA-Expression der hCAT-Isoformen 1, 2A, 2B und 3 in A673 Neuroepitheliumzellen.**

Abbildung A zeigt die relativen Mengen der verschiedenen CAT-Isoformen normiert auf den meist exprimierten Transporter hCAT-1. Nach den RT-PCR Reaktionen (Kapitel 2.3.4.1) der Transporter sowie des Haushaltsgens GAPDH (Oligonukleotide und TaqMan Sonden sind Kapitel 2.1.7 zu entnehmen) wurde zur Normalisierung der Daten der  $C_T$ -Wert des Haushaltsgens von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert ( $\Delta C_T$ ). Nach der Festsetzung des Transporters CAT-1 als „Kontrollwert“ (K) wurde jeweils die Differenz der  $C_T$ -Werte zwischen diesem und den anderen Isoformen ( $P =$  Probe) bestimmt ( $P\Delta CT - K\Delta CT$ ). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel  $2^{-(P\Delta CT - K\Delta CT)}$  berechnet. Die  $C_T$ -Werte lagen durchschnittlich bei 23 (hCAT-1), 31 (hCAT-2A), 24,5 (hCAT-2B), 25 (hCAT-3) und 15 (hGAPDH) Zyklen. Abbildung B zeigt zum Vergleich die absolute Quantifizierung der Ausgangsmoleküle pro ng Gesamt-RNA anhand der entsprechenden Standardreihen aus *in vitro* Transkripten (Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3$  in Duplikaten).

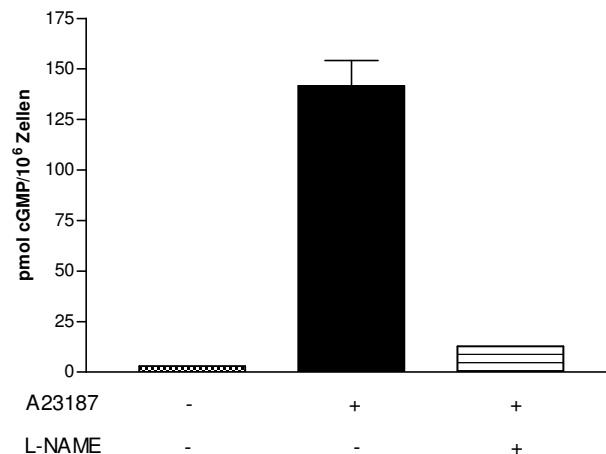
Die Transporter  $y^+$ LAT1 und  $y^+$ LAT2 waren im Vergleich zu CAT-1 in A673 Zellen 100- respektive 5 fach schwächer exprimiert (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.1.2 Vorversuche in A673 zur nNOS-Aktivität

In Vorversuchen sollte wie bei den Endothelzellen die Spezifität der Messung der nNOS-Aktivität verifiziert werden. Hierzu gehörten die Calcium-Abhängigkeit der Reaktion, die Hemmung der NO-Synthese mit einem NOS-Inhibitor sowie der Einfluss von Superoxid-Dismutase auf die Halbwertszeit von NO. Die Messung der Aktivität erfolgte standardmäßig mit dem RFL-6 Reporterzell-Assay, bei dem die lösliche Guanylat-Zyklase der RFL-6 Reporterzellen durch NO aktiviert wurde und eine zur NO-Menge proportionale cGMP-Menge gebildet wurde, die im RIA nachgewiesen werden konnte.

#### 3.2.1.2.1 Spezifität der NO-Messung und nNOS-Expression

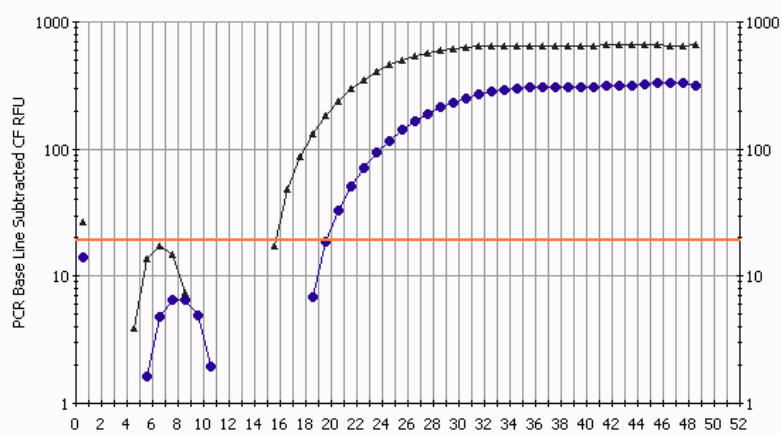
In RFL-6 Reporterzell-Experimenten (Abb. 3.27) war erkennbar, dass die gemessene NO-Produktion in A673 Zellen sowohl Calcium-sensitiv als auch mit dem NOS-Inhibitor L-NAME hemmbar war. Bei Zugabe des Calcium-Ionophors A23187 wurde ein Calcium-Influx in die Zelle bewirkt und somit das Calcium-abhängige Enzym aktiviert: Die cGMP-Ausbeute stieg um das 25 fache. Ebenso konnte mit dem für alle NOS-Isoformen wirksamen Inhibitor L-NAME die NO-Produktion auf basale Werte reduziert werden.



**Abbildung 3.27: Calcium-Abhängigkeit und Hemmbarkeit der neuronalen NO-Produktion in A673 Zellen.** Diese Abbildungen zeigt einen RFL-6 Reporterzell-Assay (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Duplikaten) von konfluenten A673 Zellen in 6-Loch Makroplatten. Nach 30-minütiger Vorinkubation in 1 mM Arginin (1. und 2. Säule) bzw. 1 mM Lysin (3. Säule) und 20 U/ml SOD wurden die zuvor 2 x mit LL gewaschenen

Zellen der 2. und 3. Säule für 2 Minuten in Anwesenheit von 1 mM Arginin (2. Säule) bzw. 1 mM Lysin (3. Säule), 20 U/ml SOD und 0,3 mM IBMX mit 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 zur NO-Produktion stimuliert. Die Überstände wurden auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehalts der RFL-6 Zellen erfolgte im RIA. Die 1. Säule zeigt die gleiche Behandlung der Zellen (1 mM Arginin) mit Ausnahme der Stimulation durch A23187. In der 3. Säule wurde die NO-Produktion durch den Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME (0,1 mM) unterbunden.

qRT-PCR Experimente haben gezeigt, dass ausschließlich die neuronale Isoform der NOS in A673 Zellen exprimiert wurde, weder die endotheliale noch die induzierbare NOS-Isoform konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.28). Mit einem  $C_T$ -Wert von 19,5 für nNOS im Vergleich zu 15,5 für GAPDH war die Expression als sehr hoch anzusehen, GAPDH war nur etwa 30 fach stärker exprimiert.

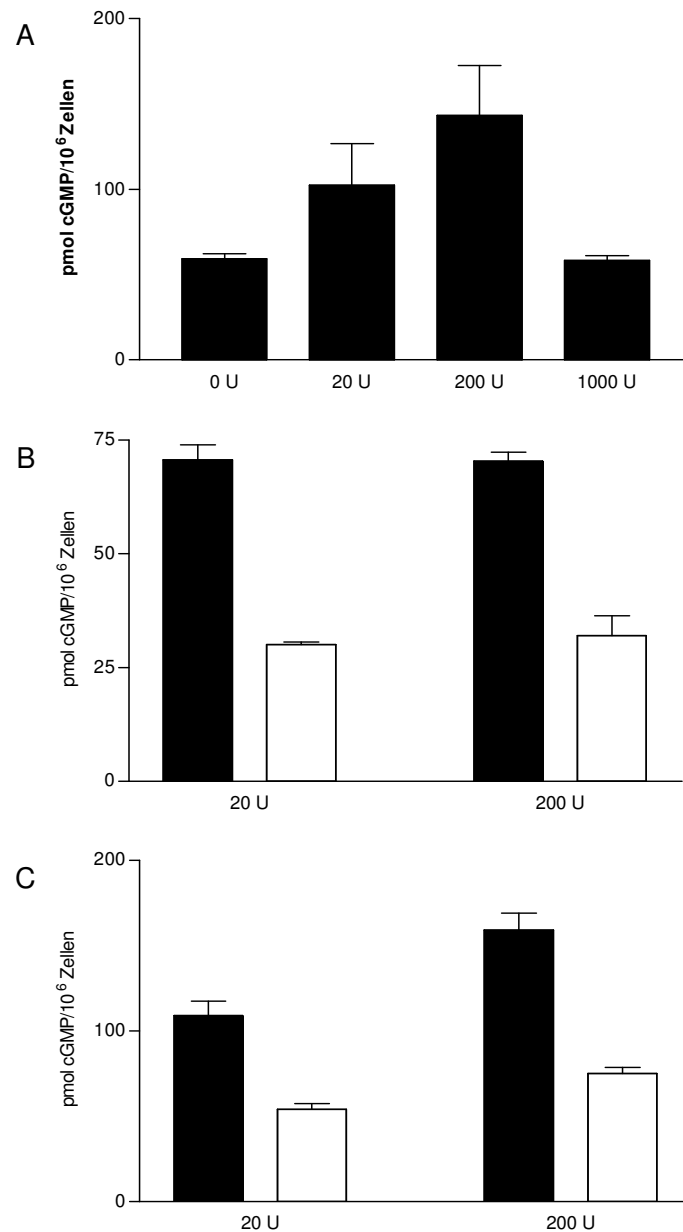


**Abbildung 3.28: Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) in A673 Zellen.**

Diese Abbildung zeigt je eine repräsentative Amplifikationskurve von nNOS (blaue Kreise) und GAPDH (schwarze Dreiecke) einer qRT-PCR aus je 0,5  $\mu$ g Gesamt-RNA (Kapitel 2.3.4.1). Zur Amplifikation der nNOS wurde das Oligonukleotid-Paar hnNOS F/hnNOS R mit der TaqMan-Sonde hnNOS TM kombiniert, für den Nachweis der GAPDH entsprechend GAPDH.502ss/GAPDH588as und hGAPDHTaq1, die Sequenzen sind in Kapitel 2.1.7 aufgeführt.

### 3.2.1.2.2 SOD-Abhängigkeit der NO-Produktion

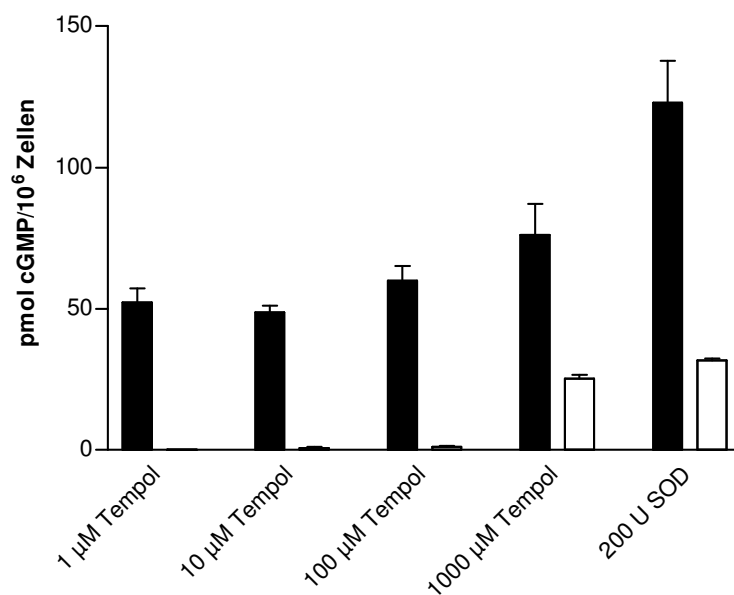
Die NO-Messung unter optimaler Substratversorgung mit 1 mM Arginin konnte auch bei A673 Zellen durch Zugabe von 20 oder 200 U des Sauerstoff-Radikalfängers SOD um jeweils das 2- respektive 3 fache gesteigert werden. Ebenfalls bewirkte der Einsatz von 1000 U SOD aus bisher noch nicht geklärter Ursache keine Steigerung der NO-Ausbeute, es wurden vielmehr die gleichen Werte wie bei keiner Zugabe des Radikalfängers gemessen (Abb. 3.29 A). In den Experimenten der Abbildungen 3.29 B und C ist erkennbar, dass die NO-Messung nach Lysin-Inkubation (weiße Balken) und somit einer Substratdepletion im Vergleich zur optimalen Substratversorgung mit Arginin (schwarze Balken) nach 30 Minuten (B) bei beiden SOD-Konzentrationen gleichbleibend war, aber nach 120 Minuten (C) durch die Gabe von 200 U SOD leicht gesteigert werden konnte. Wie im Vergleich der 20 und 200 U Experimente nach 30-minütiger Inkubation in Arginin aus Abb. A und B zu erkennen ist, konnte in einigen Versuchen die NO-Produktion durch 200 U erhöht werden. Im Folgenden wurde daher in den RFL-6 Reporterzell-Experimenten (falls nicht in Ausnahmefällen anders angegeben) eine SOD-Konzentration von 200 U/ml verwendet.



**Abbildung 3.29: Abhängigkeit der NO-Produktion in A673 Neuroepitheliomzellen von der eingesetzten Menge Superoxid-Dismutase (SOD) (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Abbildung **A** zeigt die NO-Produktion nach 30-minütiger Vorinkubation in LL mit 1 mM Arginin und verschiedenen Konzentrationen SOD: 0, 20, 200 und 1000 U/ml. Nach der 2-minütigen Stimulation in den gleichen Lösungen mit 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 und 0,3 mM IBMX wurde der Überstand auf RFL-6 Reporterzellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Bestimmung des cGMP-Gehalts erfolgte im RIA (Kapitel 2.4.2.3). Die prinzipielle Versuchsdurchführung in Abbildung **B** erfolgte wie in **A** mit dem Unterschied, dass nur die SOD-Konzentrationen 20 und 200 U/ml eingesetzt wurden und die Neuroepitheliomzellen für 30 Minuten entweder in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß) inkubiert wurden. Abbildung **C** zeigt die NO-Produktion analog zu **B** nach 120-minütiger Inkubation in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß). (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen in Triplikaten).

### 3.2.1.2.3 Einsatz des intrazellulären Sauerstoff-Radikalfängers Tempol

Da bislang nicht umfassend geklärt ist, ob der Sauerstoff-Radikalfänger SOD in die Zelle gelangen kann oder die Wirkung der Substanz lediglich außerhalb der Zelle einsetzt, wurde in einem Experiment der intrazellulär wirksame Sauerstoff-Radikalfänger Tempol eingesetzt. Mit steigenden Konzentrationen Tempol (Abb. 3.30, 1  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$ ) konnte zwar die NO-Ausbeute sowohl bei Arginin- (schwarz) als auch Lysin-inkubierten (weiß) Zellen verbessert werden, das optimale Resultat wurde jedoch mit Zugabe von 200 U/ml SOD erreicht: die NO-Ausbeute konnte um etwa ein Drittel gegenüber der höchsten verwendeten Tempol-Konzentration gesteigert werden. Aufgrund der Resultate scheint der Einsatz von SOD auszureichen, um die Stabilität von NO im RFL-6 Reporterzell-Assay während der Messung zu gewährleisten. Die Frage, ob die Substanz SOD intrazellulär (bereits am Syntheseort selbst) wirkt, konnte nicht beantwortet werden.



**Abbildung 3.30: In A673 Zellen ist unter Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) mehr NO messbar, als bei Zugabe des intrazellulären Sauerstoff-Radikalfängers Tempol (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Konfluente A673 Zellen in 6-Loch Makroplatten wurden nach 2maligem Waschen in LL für 30 Minuten in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß) mit der angegebenen Menge Tempol (1 bis 1000  $\mu\text{M}$ ) oder SOD (200 U/ml) vorinkubiert. Zur NO-Produktion wurde die gleiche LL plus 10  $\mu\text{M}$  Calcium-Ionophor A23187 und 0,3 mM IBMX für 2 Minuten auf die Zellen gegeben und nach dem Transfer des Überstandes auf RFL-6 Reporterzellen wurden auch diese 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus



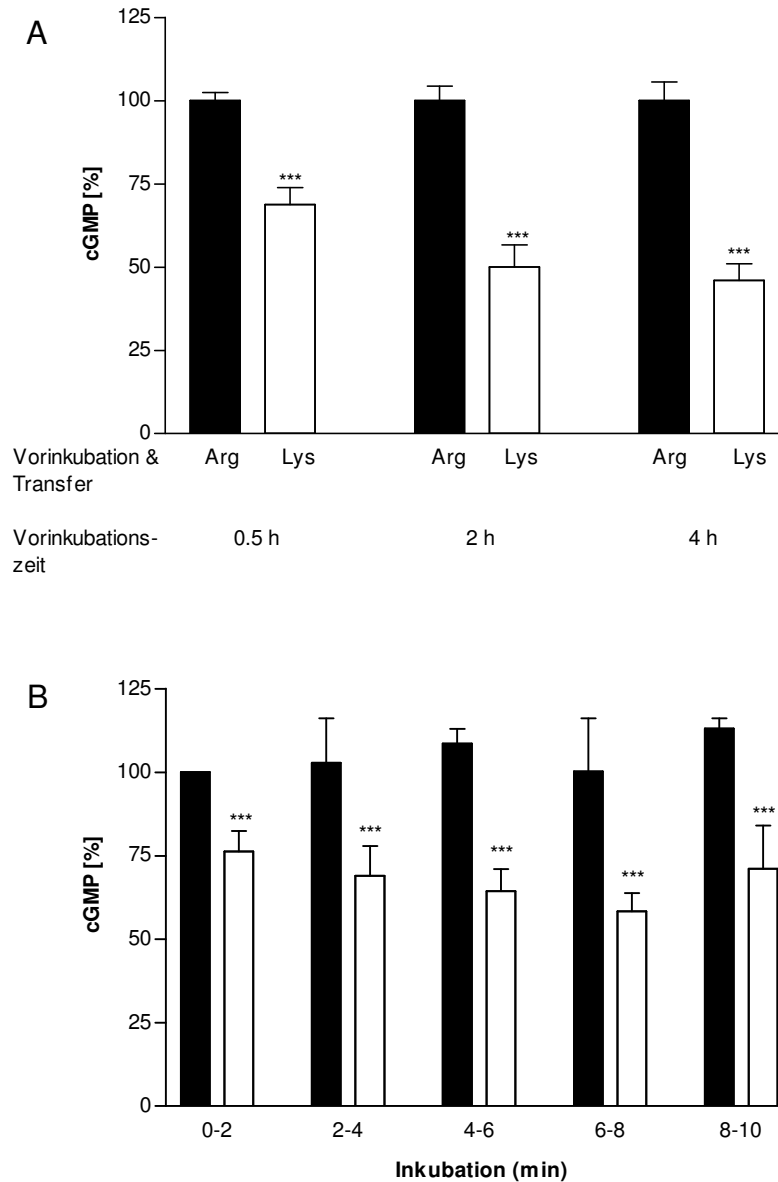
3-6 Einzelversuchen in Triplikaten dar. Ein Basalwert von  $2,5 \text{ pmol}/10^6$  Zellen wurde subtrahiert.

### **3.2.1.3 Ist das Recycling von Citrullin zu Arginin ebenfalls eine intrazelluläre Arginin-Quelle für die nNOS in A673?**

Vorherige Daten (Kapitel 3.1.1.3) haben gezeigt, dass eine intrazelluläre Arginin-Quelle in Endothelzellen das Recycling des bei der NO-Synthese entstehenden Citrullin zurück zu Arginin ist. Daher wurde von uns postuliert, dass diese Arginin-Regeneration auch in neuronalen Zellen möglich sein könnte. Die folgenden Versuche dienten der Untersuchung dieser Arbeitshypothese in A673 Zellen.

#### **3.2.1.3.1 Keine zeitabhängige Regeneration der nNOS-Aktivität**

Eine Inkubation der A673 Zellen von 0,5 Stunden in 1 mM Lysin (weiße Balken) führte im Vergleich zu Arginin-inkubierten Zellen (1 mM, schwarze Balken) zu einer Reduktion der NO-Synthese auf etwa 60% (Abb. 3.31 A). Bei Verlängerung der Inkubationsdauer in Lysin auf 2 Stunden war zunächst eine weitere Abnahme auf 50% messbar, diese nNOS-Restaktivität blieb auch über 4 Stunden bestehen. Ebenso blieb eine konstante nNOS-Restaktivität nach 30-minütiger Vorinkubation in 1 mM Lysin bei 5 aufeinander folgenden Messungen derselben NO-Produzenten in 5 verschiedenen RFL-6 Zellen erhalten (Abb. 3.31 B). Dies bedeutete, dass auch in A673 Zellen eine intrazelluläre Arginin-Quelle Substrat für die nNOS bereitstellen konnte, allerdings war mit zunehmender Inkubationsdauer unter Substratdepletion keine vollständige Regeneration der NO-Synthese wie bei Endothelzellen zu beobachten.



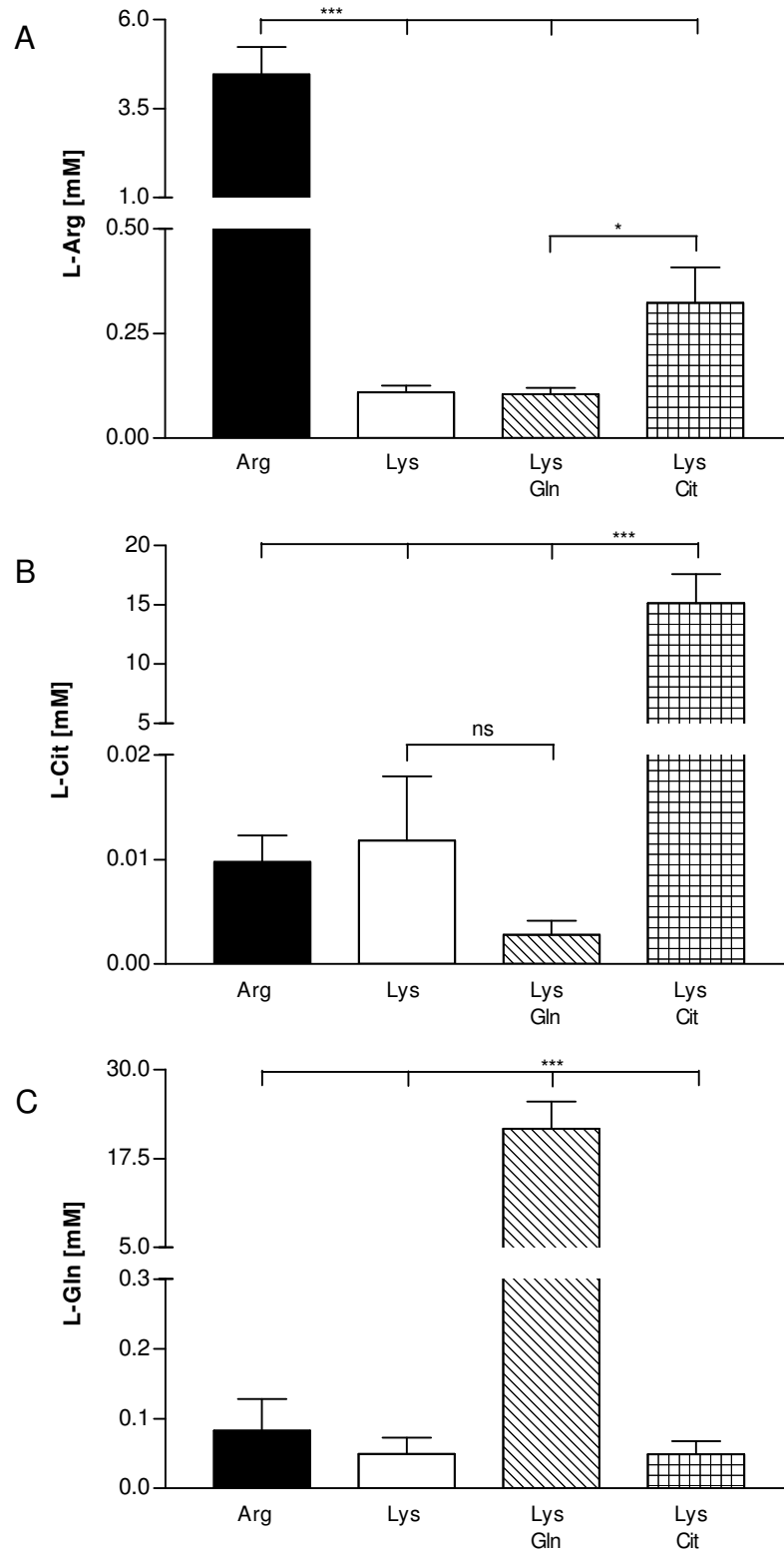
**Abbildung 3.31: Keine weitere Reduktion der NO-Synthese in teilweise depletierten A673 Zellen bei längeren Inkubationszeiten oder wiederholten Messungen (RFL-6 Reporterzell-Assay).** Abbildung **A** zeigt die cGMP-Produktion in konfluenten A673 Zellen nach Vorinkubation (0,5, 2 und 4 Stunden) in 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß). Zur NO-Synthese wurden die Zellen 2 Minuten in LL mit der entsprechenden Aminosäure (je 1 mM), 200 U/ml SOD, 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 und 0,3 mM IBMX inkubiert. Die Überstände wurden dann auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Ein basaler cGMP-Gehalt von  $4 \pm 0,5$  pmol/ $10^6$  Zellen wurde subtrahiert. Die Daten der Lysin-inkubierten Zellen sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $99 \pm 10,5$  pmol/ $10^6$  Zellen). In Abbildung **B** wurden A673 Zellen für 30 Minuten in LL mit 1 mM Arginin (schwarz) oder 1 mM Lysin (weiß) vorinkubiert. Die NO-Messung erfolgte wie in A beschrieben, mit dem Unterschied,

dass die gleichen A673 Zellen 5-mal nacheinander zur NO-Produktion benutzt wurden. Nach jedem Transfer wurde die entsprechende Lösung erneut auf die Zellen gegeben und nach 2-minütiger Inkubation auf neue RFL-6 Zellen transferiert. Die Daten der Arginin- (2-10 Minuten) und Lysin-inkubierten Zellen sind als Prozent der Werte der ersten Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $192 \pm 25,2$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 3 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *two-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,001.

### **3.2.1.3.2 Aus Citrullin regeneriertes Arginin kann nicht zur NO-Synthese genutzt werden**

HPLC-Experimente machten deutlich, dass A673 Zellen in der Lage sind, aus Citrullin Arginin zu generieren. Aus HPLC-Daten, die in Abb. 3.32 A dargestellt sind, war ersichtlich, dass nach 30-minütiger Inkubation der Zellen in Lysin plus Citrullin im Vergleich zu Lysin-inkubierten Zellen eine Verdreifachung der intrazellulären Argininkonzentration ( $0,324 \pm 0,084$  mM vs.  $0,110 \pm 0,016$  mM) erfolgte. Die Inkubation der Zellen in Lysin plus Glutamin hatte keinen Einfluss auf die intrazellulären Argininkonzentrationen.

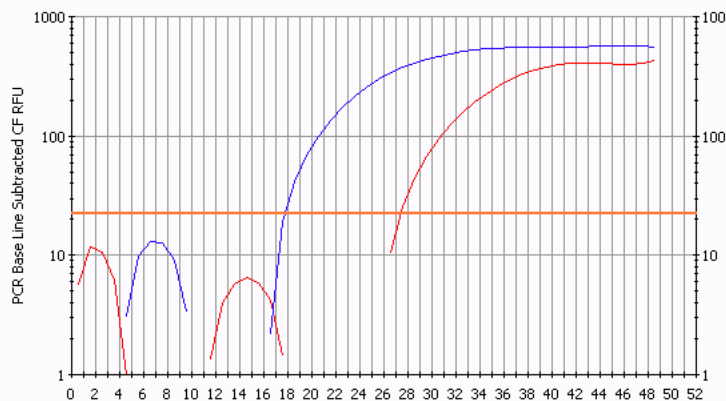
Ergebnisse aus Endothelzellen ließen einen Austausch von Glutamin gegen Citrullin vermuten, der über den System N Transporter SN1 stattfinden sollte. In A673 Zellen konnte zumindest ein Austausch von extrazellulärem Glutamin gegen intrazelluläres Citrullin gezeigt werden (Abb. 3.32 B), die Citrullinkonzentrationen wurden bei einer 30-minütigen Inkubation in Lysin plus Glutamin im Vergleich zur Inkubation in Lysin alleine um etwa 75% reduziert ( $2,8 \pm 1,4$   $\mu$ M vs.  $12,0 \pm 6,1$   $\mu$ M). Allerdings konnte bei einer Inkubation der Zellen in Lysin plus Citrullin keine Abnahme der intrazellulären Glutaminkonzentrationen gemessen werden, diese lagen aber auch bedeutend höher (Abb. 3.32 C).



**Abbildung 3.32: Verhältnis zwischen extra- und intrazellulären Glutamin-, Citrullin- und Argininkonzentrationen in A673 Zellen (HPLC).** Konfluente A673 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit 1 mM der angegebenen Aminosäuren (Arginin schwarz, Lysin weiß, Lysin plus Glutamin gestreift, Lysin plus Citrullin kariert) inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal in eiskaltem PBS gewaschen und die Aminosäuren mit 70% Ethanol

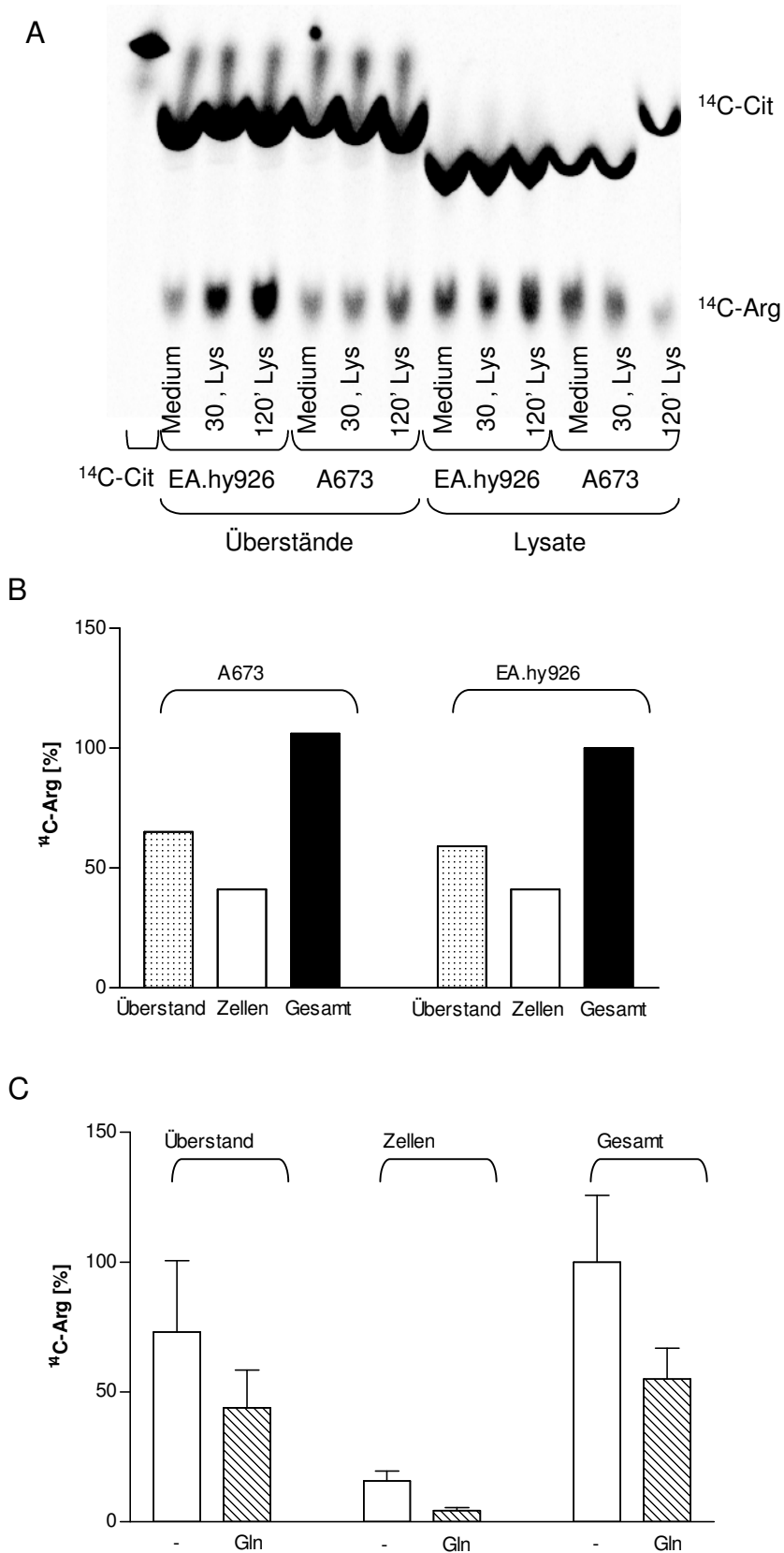
extrahiert. Die HPLC Analyse der angegebenen Aminosäuren (A: Arginin, B: Citrullin, C: Glutamin) wurde, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4-7 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test.

Der Transporter SN1 war in A673 Zellen um den Faktor 10 stärker exprimiert, als in EA.hy926 Endothelzellen ( $C_T$  30,2 in A673 Abb. 3.33 vs  $C_T$  33 in EA.hy926 Abb. 3.15).



**Abbildung 3.33: Expression des System N Transporters SN1 in A673 Zellen (qRT-PCR).** In dieser Abbildung ist eine repräsentative Amplifikationskurve von Leber (blau,  $C_T$  19,2) und A673 (rot,  $C_T$  30,2) einer qRT-PCR aus je 0,5  $\mu$ g Gesamt-RNA dargestellt (Kapitel 2.3.4.1). Die Amplifikation des 136 bp großen Fragments erfolgte mit dem Oligonukleotid-Paar hSN1.625ss und hSN1.760as, zur spezifischen Detektion wurde die TaqMan Sonde hSN1.Taq1 eingesetzt.

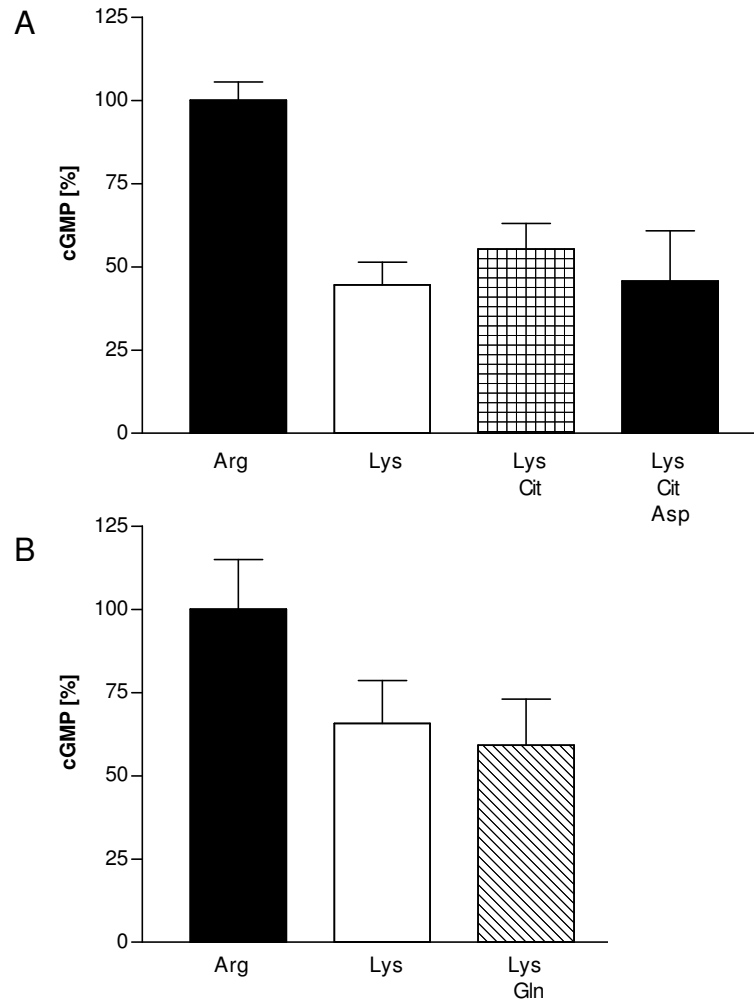
Aus Recyclingexperimenten mit A673 und EA.hy926 Zellen in Medium ging hervor, dass beide Zelltypen im gleichen Umfang Citrullin zu Arginin umsetzen konnten (Abb. 3.34 A und B), dabei war jeweils mehr als die Hälfte dieses Arginins im Überstand (Abb. 3.34 B, graue Balken) zu finden. Auch in A673 Zellen hemmte Glutamin die Regeneration von Arginin aus Citrullin in intakten Zellen (Abb. 3.34 C).



**Abbildung 3.34: Konversion von  $^{14}\text{C}$ -Citruillin zu  $^{14}\text{C}$ -Arginin in A673 und EA.hy926 Zellen im Vergleich (Dünnschichtchromatographie). Abbildung A zeigt ein**

repräsentatives Bild einer Auftrennung von  $^{14}\text{C}$ -Citrullin und  $^{14}\text{C}$ -Arginin mittels Dünnschichtchromatographie. Die konfluenten Zellen wurden wie angegeben entweder direkt aus Medium oder nach 30- oder 120-minütiger Vorinkubation in 1 mM Lysin für 60 Minuten in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin inkubiert. Es wurden zum einen Überstand direkt aufgetragen und zum anderen lysiertes Zelllysate (siehe Kapitel 2.4.4.). Das unterschiedliche Laufverhalten des Citrullins von Überstand und Lysat resultierte wahrscheinlich aus einer Interaktion mit anderen Komponenten in Lysat und Überstand, die das Laufverhalten beeinflussten (siehe auch Abbildung 2.7). Die Auftragung erfolgte auf Kieselgel-beschichteten DC-Fertigplatten mit dem Laufmittel Chloroform : Methanol : Ammoniumhydroxid : Wasser (0,5 : 4,5 : 2,0 : 1,0). Abbildung **B** zeigt die quantitative Auswertung des Einzelerperimentes aus **A** nach 60-minütiger Inkubation in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin nach Vorinkubation in Medium: Die  $^{14}\text{C}$ -Arginin-Spots des Überstandes (grau), des Lysates (weiß) und des Gesamten (schwarz) wurden densitometrisch mit dem Phospho-Imager ausgewertet und als Prozent des Gesamtwertes aus EA.hy926 Zellen dargestellt. Abbildung **C** stellt die Auswertung des recycelten Arginins in A673 Zellen von Überstand, Zellen und Gesamt aus 4 Einzelerperimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM) nach 30 min Inkubation in  $^{14}\text{C}$ -Citrullin plus Lysin (weiß) und Lysin plus Glutamin (gestreift) dar. Die Daten sind als Prozent der Werte des Gesamt-recycelten Arginins in Lysin errechnet.

Bei der Messung von bioaktivem NO in A673 Zellen konnte die NO-Produktion jedoch weder mit Citrullin (mit oder ohne Zugabe von Aspartat) gesteigert, noch durch Glutamin gehemmt werden (Abb. 3.35), eine 30-minütige Inkubation der Zellen in Lysin plus Citrullin oder Glutamin zeigte keine Änderung der cGMP-Spiegel im Vergleich zu Lysin-inkubierten Zellen. Dies bedeutete, dass A673 Zellen zwar in der Lage waren, Citrullin zu Arginin zu recyceln, dieses Arginin schien jedoch der nNOS nicht als Substrat zur Verfügung zu stehen. Dementsprechend konnte der nachgewiesene Austausch von extrazellulärem Glutamin gegen intrazelluläres Citrullin auch keinen Einfluss auf die NO-Produktion bewirken.

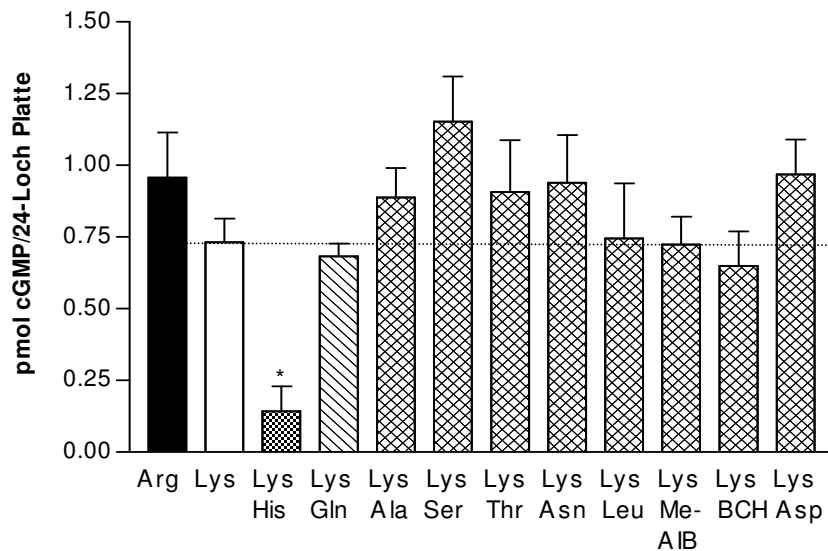


**Abbildung 3.35: Citrullin ist nicht in der Lage, die Reduktion der NO-Synthese in A673 Zellen wieder aufzuheben, Glutamin hat ebenfalls keinen Einfluss auf die NO-Produktion in diesen Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).** A673 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) und 200 U SOD vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Citrullin, 4 mM Aspartat, 4 mM Glutamin. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Daten sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100% =  $174,7 \pm 15,4$  pmol/ $10^6$  Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar.

Die einzige der untersuchten Aminosäuren, die einen Einfluss auf die NO-Produktion in A673 Zellen hatte, ist Histidin (Abb. 3.36): Sie verminderte die NO-Synthese im Vergleich zu Lysin-inkubierten Zellen drastisch von etwa 75 auf 10%. Alle weiteren Aminosäuren (Glutamin, Alanin, Serin, Threonin, Asparagin, Leucin, Aspartat, alle 4 mM) oder Modellssubstrate von Glutamin-Transportsystemen



(MeAIB, BCH, je 4 mM) waren nicht in der Lage, eine verminderte nNOS-Aktivität zu bewirken.



**Abbildung 3.36: Ausschließlich Histidin reduziert die NO-Produktion in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).** A673 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) vorinkubiert: Arginin, Lysin (je 1 mM), Histidin, Glutamin, Alanin, Serin, Threonin, Asparagin, Leucin, MeAIB, BCH, Aspartat (alle 4 mM). Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A (allerdings statt in 6-Loch Makroplatten in 24-Loch Platten) durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*) kennzeichnet P-Wert  $< 0,05$ .

Da extrazelluläres Histidin über den System N Transporter SN1 ebenso wie in Endothelzellen einen Austausch gegen intrazelluläres Citrullin bewirken könnte, dieses aber aufgrund der oben aufgeführten Gründe keinen Einfluss auf die NO-Produktion haben kann, scheint die Wirkung von Histidin in diesem Zelltyp analog zu Endothelzellen in der Depletion von Peptiden aus Proteinabbau über den Peptid-Histidin-Transporter PHT1 begründet zu sein. Inwieweit Proteinabbau als Substratquelle für die neuronale NOS in A673 Zellen eine Rolle spielt, wird im folgenden Kapitel näher charakterisiert.

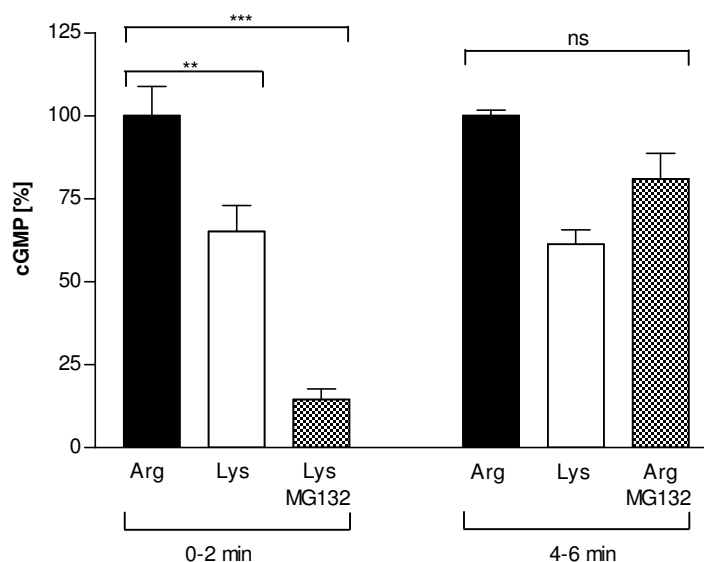
### 3.2.1.4 In A673 Neuroepitheliumzellen stellt der Proteinabbau die einzige intrazellulären Arginin-Quelle für die nNOS dar

Da A673 Zellen zwar prinzipiell in der Lage waren, aus Citrullin zu Arginin herzustellen, dieses aber nicht als Substrat für die nNOS genutzt werden konnte, blieb als einzige Möglichkeit die nNOS-Restaktivität unter Substratdepletion durch Lysin mit Proteinabbau zu erklären.

Unter Bedingungen, bei denen das austauschbare Arginin durch extrazelluläres Lysin depletiert wurde, konnte eine restliche NO-Produktion von 50-75% in A673 Zellen beobachtet werden. Die einzige Arginin-Quelle könnte demnach der Abbau von Proteinen durch das Proteasom oder die Lysosomen sein. Die entstandenen Peptide würden wie in Endothelzellen von einer Peptidase in die einzelnen Aminosäuren gespalten und das dabei freigesetzte Arginin als Substrat für die nNOS verfügbar.

#### 3.2.1.4.1 Hemmung des Proteinabbaus führt zur Reduktion der nNOS-Aktivität

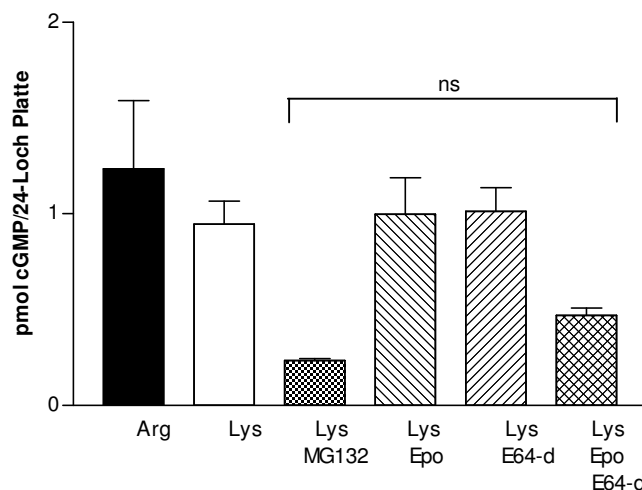
Die unter Lysin-Inkubation verbleibende nNOS-Aktivität konnte in der Tat durch Inkubation der Zellen in Lysin (1 mM) und dem so genannten Proteasominhibitor MG132 (1  $\mu$ M) auf 10% reduziert werden. Diese Hemmung konnte nahezu vollständig durch extrazelluläres Arginin wieder aufgehoben werden (Abb. 3.37).



**Abbildung 3.37: Der Proteasominhibitor MG132 hemmt die neuronale NO-Produktion in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay).** A673 Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) bei 20

U/ml SOD vorinkubiert: 1 mM Arginin (schwarz), 1 mM Lysin (weiß) oder 1 mM Lysin plus 1  $\mu$ M Proteasom-Inhibitor MG132 (kariert). Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A durchgeführt, eine anschließende 2. und 3. Inkubation zur NO-Produktion erfolgte statt in Lysin plus MG132 in Arginin und dem Proteasominhibitor. Die Daten sind als Prozent der Werte der korrespondierenden Kontrollzellen in Arginin errechnet (100%= 31,5 $\pm$ 1,7 pmol/10<sup>6</sup> Zellen). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,001, (\*\*) kennzeichnet P-Wert < 0,01, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

Da der Proteasominhibitor MG132 nicht nur das Proteasom hemmt, sondern auch lysosomale Enzyme in ihrer Funktion beeinträchtigen kann, sollte durch den Einsatz von spezifischeren Substanzen zwischen proteasomalem und lysosomalem Abbau unterschieden werden und damit der Einfluss beider Abbauewege auf die Substratverfügbarkeit für NO-Synthasen differenziert werden. Wie im Experiment aus Abb. 3.38 ersichtlich ist, führte ausschließlich die Kombination des lysosomalen Inhibitors E64-d (20  $\mu$ M) mit dem proteasomalen Inhibitor Epoxomicin (1  $\mu$ M) zu einer Reduktion der NO-Synthese, die sich nicht signifikant von der Reduktion durch die Substanz MG132 unterscheidet.



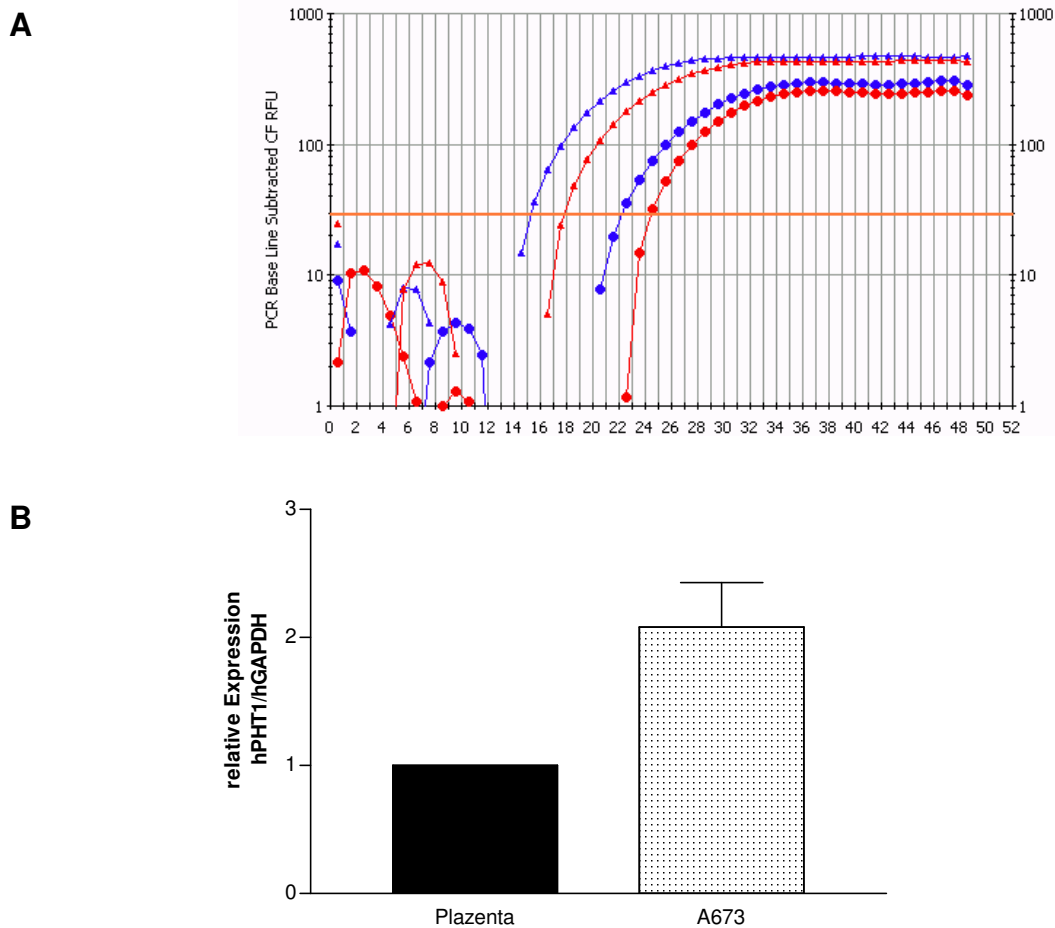
**Abbildung 3.38: Einfluss von lysosomalem und proteasomalem Proteinabbau in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay).** In dieser Abbildung wurde im Vergleich zur (als Proteasominhibitor bekannten, aber nicht spezifischen) Substanz MG132 die spezifischeren Inhibitoren Epoxomicin (1  $\mu$ M, Proteasom) und E64-d (20  $\mu$ M, Lysosom) einzeln und in Kombination eingesetzt. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A (allerdings statt in 6-Loch Makroplatten in 24-Loch Platten) durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-4 Einzelversuchen mit Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way*

ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

Beide Inhibitoren für sich bewirkten keine Hemmung der nNOS-Aktivität, da der jeweils zweite Abbauweg dies zu kompensieren scheint. Ergebnisse aus der Dissertation von Susanne Karbach bestätigen diese Hypothese in EA.hy926 Endothelzellen. Als Alternative zum lysosomalen Inhibitor E64-d kann 1  $\mu$ M Chloroquin verwendet werden.

#### **3.2.1.4.2 Der Peptid-Histidin-Transporter PHT1 ist in A673 Zellen exprimiert**

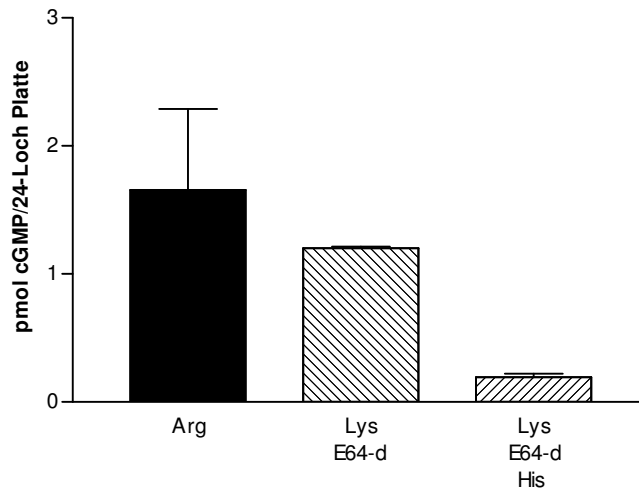
Die Feststellung, dass Histidin als einzige getestete Aminosäure die NO-Produktion hemmen kann (Abb.3.36), kombiniert mit der Tatsache, dass die nNOS-Aktivität unter Substratdepletion durch Lysin nur durch Proteinabbau zu einem Teil aufrecht erhalten werden kann, lässt vermuten, dass analog zu Endothelzellen, Histidin die Depletion der Peptide verursacht. Das extrazelluläre Histidin würde gegen intrazelluläre (argininhaltige-) Peptiden ausgetauscht, die beim Abbau von Proteinen durch das Proteasom und die Lysosomen entstehen. Der einzige bis heute bekannte Transporter, der sowohl Histidin als auch Di- und Tripeptide als Substrate akzeptiert, ist der noch sehr wenig charakterisierte Peptid-Histidin-Transporter PHT1. Er war in A673 Neuroepitheliumzellen doppelt so hoch exprimiert wie in Plazenta (Abb. 3.39), dem Gewebe, aus dem er ursprünglich kloniert worden war. Der Nachweis, dass PHT1 tatsächlich als Histidin-Peptid-Austauscher fungiert, muss allerdings noch erbracht werden. Der zweite Transporter dieser Familie, PHT2, konnte nicht detektiert werden. Die Peptid-Transporter PepT1 und PepT2 konnten ebenfalls in A673 Zellen mittels qRT-PCR detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Mit  $C_T$ -Werten von 28,6 und 24,6 sind sie jedoch gegenüber PHT1 ( $C_T$  22,1) um den Faktor 100 bzw. 10 schwächer exprimiert.



**Abbildung 3.39: Expression des Peptid/Histidin-Transporters PHT1 in A673 Zellen (qRT-PCR).** Abbildung A stellt je eine repräsentative Amplifikationskurve des PHT1 in Plazenta (rote Kreise,  $C_T$  24,4) und A673 (blaue Kreise,  $C_T$  22,1) dar. Die Standard RT-PCR-Ansätze mit je 0,5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit dem Standard RT-PCR-Profil mit 50 Zyklen bei einer „Annealing“-Temperatur von 60°C durchgeführt (Kapitel 2.3.4). Die Sequenzen der Oligonukleotide hPHT1.1444ss, hPHT1.1525as und hPHT1.Taq1 sind in Kapitel 2.1.7 aufgeführt. Zur Bestimmung der relativen Expression des Transporters in den Neuroepitheliumzellen im Vergleich zur Positivkontrolle Plazenta, woraus der Transporter ursprünglich kloniert wurde, musste zusätzlich GAPDH (blaue und rote Dreiecke) als Haushaltsgen bestimmt werden (GAPDH.502ss, GAPDH.588as, hGAPDHTaq1). Abbildung B zeigt die relative Expression in A673 Zellen im Vergleich zu Plazenta. Die Berechnung ist Abbildung 3.2 zu entnehmen. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=10).

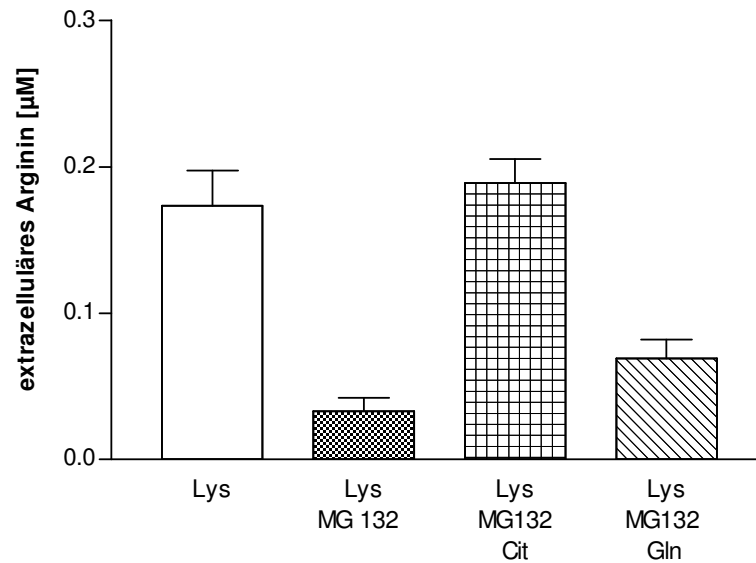
Da der Transporter PHT1 auch in der lysosomalen Membran lokalisiert sein könnte, wurde im folgenden Experiment ausgeschlossen, dass Histidin einen Einfluss nicht an der lysosomalen, sondern an der äußeren Zellmembran hatte. Die Kombination von Histidin mit dem spezifischen Inhibitor des lysosomalen Proteinabbaus E64-d zeigte, dass Histidin auch in Anwesenheit von E64-d seine

Hemmung der NO-Produktion beibehält (Abb. 3.40). Dies bedeutete, dass Peptide aus proteasomalem Abbau weiter über die Zellmembran depletiert wurden (Peptide aus Lysosomen sind durch den Inhibitor E64-d unterbunden). Ein weiterer Hinweis, dass Histidin nicht am Lysosom wirken kann, ist der, dass Histidin die Peptide dann vermehrt aus dem Lysosom ins Cytosol transportieren würde und somit die nNOS mit Substrat versorgen könnte. Wenn Histidin jedoch am Transporter an der Zellmembran eingreift, würden die Peptide in den Extrazellulärraum geschleust und somit der nNOS entzogen.



**Abbildung 3.40: Einfluss von Histidin am PHT1 in der Zellmembran und nicht in der lysosomalen Membran in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay).** A673 Zellen wurden für 30 Minuten in Arginin oder Lysin (je 1 mM) und dem lysosomalen Inhibitor E64-d (20  $\mu$ M) mit und ohne Histidin (4 mM) in den oben angegebenen Kombinationen inkubiert. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A (allerdings statt in 6-Loch Makroplatten in 24-Loch Platten) durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit Einzelwerten dar.

Messungen der Argininkonzentrationen aus Überständen von 10 cm-Zellkulturschalen sind in Abb. 3.41 dargestellt. Nach Inkubation mit dem Proteinabbau-Inhibitor MG132 wurde eine deutlich verringerte extrazelluläre Argininkonzentration im Vergleich zu Lysin-inkubierten Zellen gemessen. Citrullin konnte diese Reduktion unter Hemmung des Proteinabbaues aufheben, wie aber bereits aus Abb. 3.35 ersichtlich ist, konnten A673-Zellen dieses aus Recycling stammende Arginin nicht zur NO-Synthese nutzen.



**Abbildung 3.41: MG132, ein Inhibitor des Proteinabbaus, reduziert die extrazellulär messbaren Arginin-Konzentrationen aus A673 Zellen, Citrullin kann diese Reduktion wieder aufheben (HPLC).** Konfluente A673 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen wurden 2-mal in LL gewaschen und eine halbe Stunde in LL mit 1 mM Lysin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine weitere halbe Stunde in 1 mM Lysin mit oder ohne 1  $\mu\text{M}$  MG132 inkubiert, letztere zusätzlich mit Citrullin oder Glutamin (je 4 mM). Das Medium wurde jeweils alle 15 Minuten erneuert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation in den angegebenen Aminosäuren (1 mM) mit oder ohne 1  $\mu\text{M}$  MG132. Die Überstände (2 ml) wurden abgenommen, mit 30 nmol SDMA als internem Standard versetzt und einer HPLC-Analyse unterzogen.

### **3.2.2 Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase in TGW-nu-I Neuroblastomzellen**

TGW-nu-I Zellen, isoliert aus einem humanen Neuroblastom, sind bekannt für ihre relativ hohe Expression von nNOS mRNA und Protein, die vergleichbar ist mit dem nNOS-reichem Cerebellum (Fujisawa H et al., 1994). Da es sich bei diesen Zellen um einen Zelltyp handelt, der nativen Neuronen ähnlicher ist als A673 Neuroepitheliomzellen, wurden mit ihnen einige Kernexperimente zur Substratversorgung der nNOS durchgeführt. Die nNOS-Aktivität war jedoch deutlich geringer als in A673 Zellen und daher schwerer messbar.

#### **3.2.2.1 Vorversuche in TGW-nu-I zur nNOS-Aktivität**

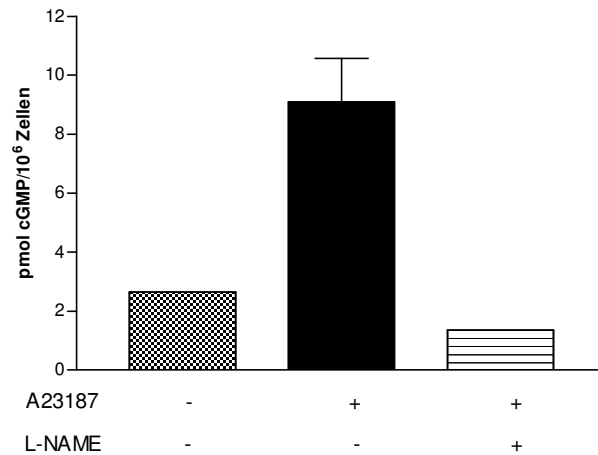
In Vorversuchen im RFL-6 Reporterzell-Assay sollte wie in A673 Zellen die Spezifität der Messung der nNOS-Aktivität sichergestellt werden durch Überprüfung der Calcium-Abhängigkeit der Reaktion sowie deren Hemmung mit einem NOS-Inhibitor.

##### **3.2.2.1.1 Spezifität der NO-Messung**

Die in RFL-6 Reporterzell-Experimenten (Abb. 3.42) gemessene NO-Produktion in TGW-nu-I Zellen war sowohl Calcium-sensitiv als auch mit dem NOS-Inhibitor L-NAME hemmbar.

Bei Zugabe des Calcium-Ionophors A23187 stieg die cGMP-Ausbeute um das 3-4 fache. Diese Steigerung konnte durch den NOS-Inhibitor L-NAME auf basale Werte reduziert werden.



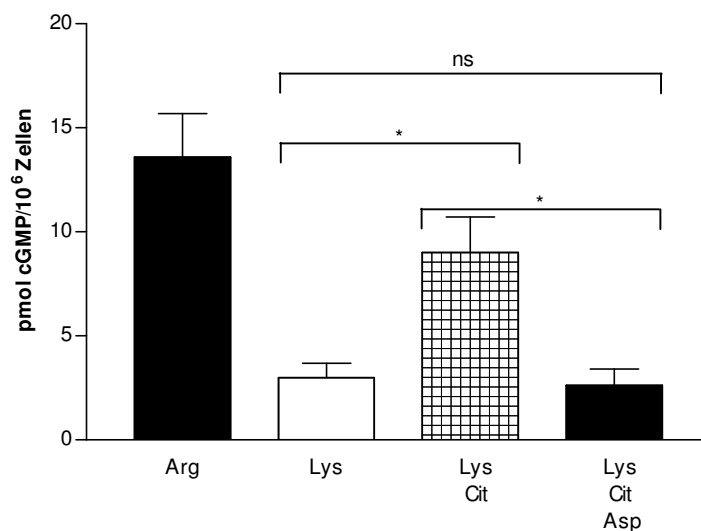


**Abbildung 3.42: Calcium-Abhängigkeit und Hemmbarkeit der neuronalen NO-Produktion in TGW-nu-I Zellen.** Diese Abbildungen zeigt einen RFL-6 Reporterzell-Assay (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 2 Einzelversuchen in Duplikaten) von konfluenten TGW-nu-I Zellen in 6-Loch Makroplatten. Nach 30-minütiger Vorinkubation in 1 mM Arginin (1. und 2. Säule) bzw. 1 mM Lysin (3. Säule) und 20 U/ml SOD wurden die zuvor 2 x mit LL gewaschenen Zellen der 2. und 3. Säule für 2 Minuten in Anwesenheit von 1 mM Arginin (2. Säule) bzw. 1 mM Lysin (3. Säule), 20 U/ml SOD und 0,3 mM IBMX mit 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 zur NO-Produktion stimuliert. Die Überstände wurden auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehalts der RFL-6 Zellen erfolgte im RIA. Die 1. Säule zeigt die gleiche Behandlung der Zellen (1 mM Arginin) mit Ausnahme der Stimulation durch A23187. In der 3. Säule wurde die NO-Produktion durch den Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME (0,1 mM) unterbunden.

### 3.2.2.2 TGW-nu-I Zellen können aus Citrullin regeneriertes Arginin zur NO-Synthese nutzen

Eine Inkubation der Zellen in 1 mM Lysin (Abb. 3.43, weiße Balken) über einen Zeitraum von 30 Minuten führte zu einer Abnahme der NO-Produktion auf etwa 25% im Vergleich zu Arginin-inkubierten Zellen (schwarze Balken). Leider konnten die TGW-nu-I nicht über längere Zeiträume in LL inkubiert werden, da die Zellen dann abstarben.

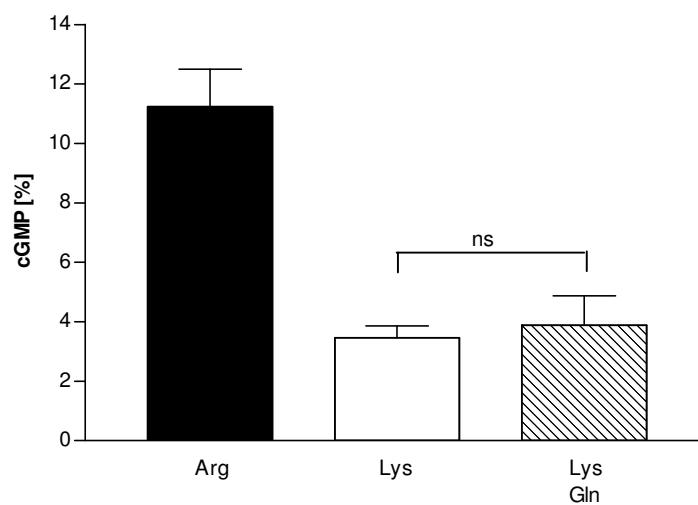
Nach Zugabe von 4 mM Citrullin konnte die Reduktion der NO-Synthese signifikant vermindert werden (karierte Balken), was impliziert, dass die TGW Zellen wie die A673 Neuroepitheliumzellen in der Lage waren, Citrullin zu Arginin zu recyceln im Gegensatz zu diesen das gebildete Arginin aber für die NO-Synthese nutzen konnten. Erstaunlicherweise war dies bei der Kombination der beiden für das Recycling notwendigen Aminosäuren Citrullin und Aspartat nicht der Fall.



**Abbildung 3.43: Citrullin alleine, aber nicht in Kombination mit Aspartat ist in der Lage, die Reduktion der NO-Synthese in TGW-nu-I Zellen wieder aufzuheben (RFL-6 Reporterzell Assay).** TGW-nu-I Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) und 20 U SOD vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Citrullin, 4 mM Aspartat. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*) kennzeichnet P-Wert < 0,05, *ns* kennzeichnet P-Werte > 0,05, die als nicht signifikant angesehen werden.

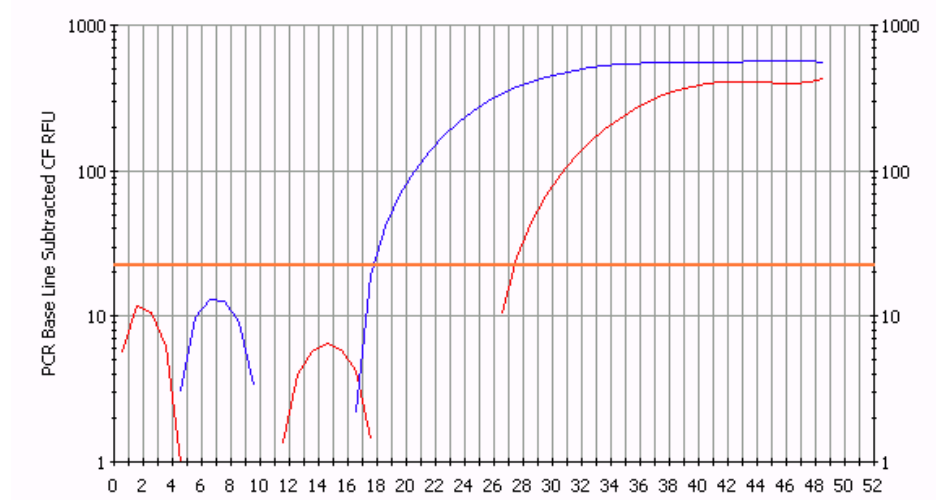
### 3.2.2.2.1 Trotz moderater Expression des System N Transporters SN1 kann Glutamin die NO-Synthese in TGW-nu-I nicht zusätzlich beeinflussen

Da Citrullin die NO-Produktion in TGW-nu-I steigern konnte, war zu vermuten, dass analog zu Endothelzellen eine Hemmung des Recyclingweges durch Glutamin möglich sein würde, da intrazelluläres Citrullin durch extrazelluläres Glutamin ausgetauscht werden würde. Wie im RFL-6 Reporterzell-Assay in Abb. 3.44 zu erkennen ist, hatte Glutamin (gestreifte Balken) jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf die NO-Produktion in TGW-nu-I Zellen.



**Abbildung 3.44: Glutamin hat keinen Einfluss auf die NO-Synthese in TGW-nu-I Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).** TGW-nu-I Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) und 20 U SOD vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Glutamin. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt *ns* kennzeichnet P-Werte  $> 0,05$ , die als nicht signifikant angesehen werden.

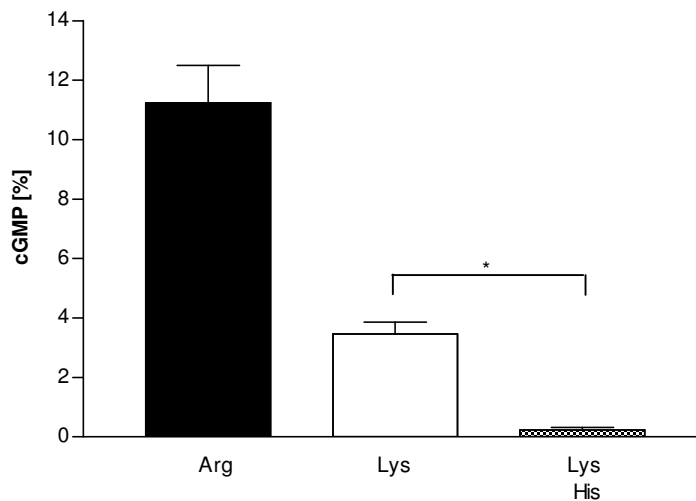
Dies könnte durch die fehlende Expression des putativen Glutamin-Citrullin-Austauschers SN1 zu erklären sein, doch qRT-PCR-Experimente zeigten eine moderate Expression in TGW-nu-I, die 5 fach stärker war als in EA.hy 926 Endothelzellen (Abb. 3.45), sodass eher eine stärkere Wirkung von Glutamin zu erwarten wäre.



**Abbildung 3.45: Expression des System N Transporters SN1 in TGW-nu-I Zellen (qRT-PCR).** In dieser Abbildung ist eine repräsentative Amplifikationskurve einer qRT-PCR dargestellt mit je 0,5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus Leber (blau,  $C_T$  17,7) und TGW-nu-I (rot,  $C_T$  27,3) (Kapitel 2.3.4.1). Die Amplifikation des 136 bp großen Fragments erfolgte mit dem Oligonukleotid-Paar hSN1.625ss und hSN1.760as, zur spezifischen Detektion wurde die TaqMan Sonde hSN1.Taq1 eingesetzt.

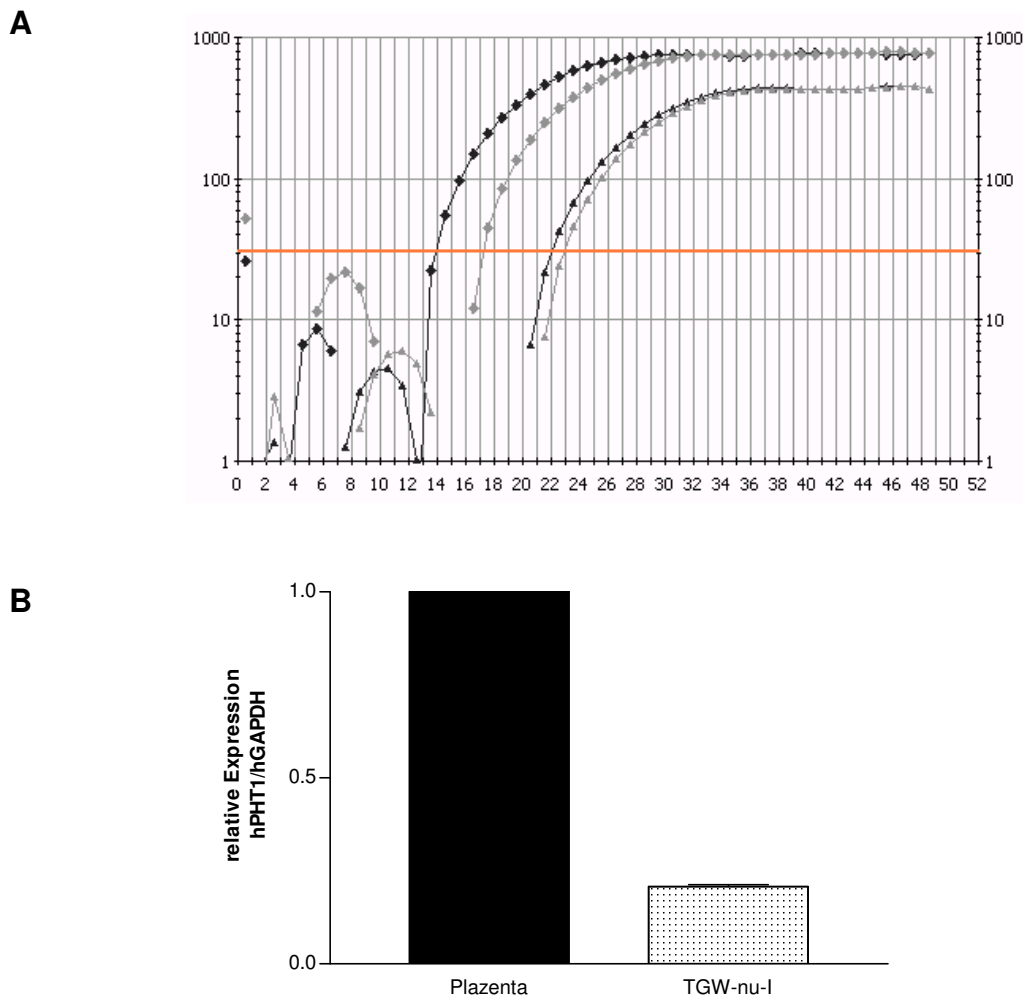
### 3.2.2.3 In TGW-nu-I Neuroblastomzellen stellt der Proteinabbau eine weitere intrazelluläre Arginin-Quelle für die nNOS dar

Die unter Lysin-Inkubation verbleibende 25% nNOS-Aktivität konnte durch den Einsatz der Aminosäure Histidin (4 mM) vollständig gehemmt werden (Abb. 3.46). Unserer Hypothese zufolge müsste diese Restaktivität aus Proteinabbau gespeist werden. Histidin könnte die aus proteasomalem und/oder lysosomalem Abbau stammenden Di- und Tripeptide über den Peptid-Histidin-Transporter PHT1 austauschen. Wie in qRT-PCR-Experimenten in Abb. 3.47 ersichtlich ist, wird dieser Transporter in TGW-nu-I Neuroblastomzellen exprimiert. Die Stärke der PHT1-Expression ist mit der in Endothelzellen vergleichbar (siehe Abb. 3.18).



**Abbildung 3.46: Histidin hemmt die NO-Synthese in TGW-nu-I Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).** TGW-nu-I Zellen wurden für 30 Minuten in LL mit den angegebenen Aminosäuren (einzeln oder in Kombination) und 20 U SOD vorinkubiert: 1 mM Arginin, 1 mM Lysin, 4 mM Histidin. Die NO-Messung wurde wie in Abb. 3.31 A durchgeführt, die Messung des cGMP-Gehaltes erfolgte im RIA. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Einzelversuchen mit je 2 Einzelwerten dar. Die statistische Analyse wurde mit dem *one-way* ANOVA-Varianztest mit anschließendem Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt, (\*) kennzeichnet P-Wert  $< 0,05$ .

Künftige Experimente mit den proteasomalen und lysosomalen Inhibitoren Epoxomicin und E64-d bzw. Chloroquin sollen diese Hypothese weiter bestätigen.

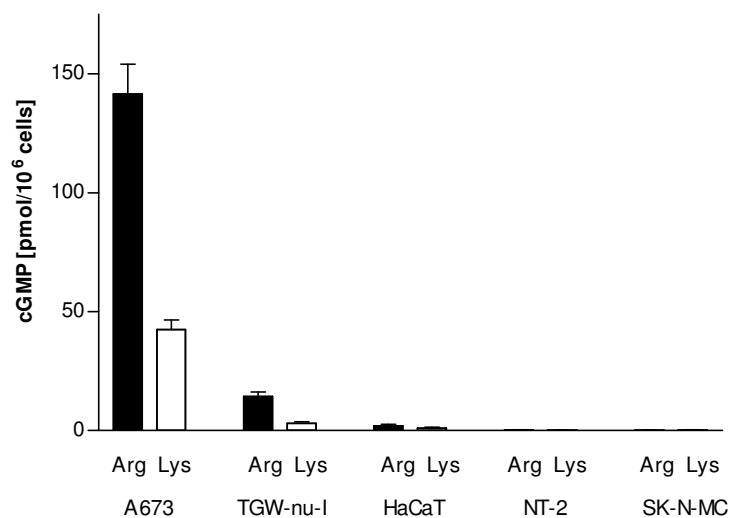


**Abbildung 3.47: Expression des Peptid/Histidin-Transporters PHT1 in TGW-nu-I Zellen (qRT-PCR).** Abbildung A stellt je eine repräsentative Amplifikationskurve des PHT1 in Plazenta (graue Dreiecke,  $C_T$  23) und TGW-nu-I (schwarze Dreiecke,  $C_T$  22) dar. Die Standard RT-PCR-Ansätze mit je 0,5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit dem Standard RT-PCR-Profil mit 50 Zyklen bei einer „Annealing“-Temperatur von 60°C durchgeführt (Kapitel 2.3.4). Die Sequenzen der Oligonukleotide hPHT1.1444ss, hPHT1.1525as und hPHT1.Taq1 sind in Kapitel 2.1.7 aufgeführt. Zur Bestimmung der relativen Expression des Transporters in den Neuroblastomzellen im Vergleich zur Positivkontrolle Plazenta, woraus der Transporter ursprünglich kloniert wurde, wurde zusätzlich GAPDH als Haushaltsgen bestimmt (GAPDH.502ss, GAPDH.588as, hGAPDHTaq1). Abbildung B zeigt die relative Expression in TGW-nu-I Zellen im Vergleich zu Plazenta. Die Berechnung ist Abbildung 3.2 zu entnehmen. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=3-4).

Die Peptid-Transporter PepT1 und PepT2 konnten ebenfalls in TGW-nu-I Zellen mittels qRT-PCR detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Mit  $C_T$ -Werten von 25 und 22,9 sind sie gegenüber PHT1 ( $C_T$  22) um den Faktor 10 bzw. Faktor 3 schwächer exprimiert.

### 3.2.3 Charakterisierung von weiteren nNOS-exprimierenden Zelllinien

Die aus dem Screening der menschlichen Zellen hervorgegangenen weiteren Linien mit signifikanter nNOS-Expression SK-N-MC (Neuroblastom), NT-2 (Teratokarzinom) und HaCaT (Keratinocyten-artig) wurden ebenfalls im RFL-6 Reporterzell-Assay auf ihre nNOS-Aktivität untersucht. Wie im Vergleich zu A673 Neuroepitheliom- und TGW-nu-I Neuroblastomzellen in Abb. 3.48 zu erkennen ist, konnte keine ausreichende NO-Produktion gemessen werden. Auch eine Behandlung der NT-2 und SK-N-MC Zellen für 24 und 48 Stunden mit 200  $\mu$ M Dibutyryl-cAMP (db-cAMP), die die nNOS-mRNA-Expression steigert, führte zu keinem Anstieg der NO-Synthese (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.48: NO-Produktion von nNOS-exprimierenden Zellen im Vergleich.** Diese Grafik zeigt die Auswertung eines RFL-6 Reporterzell-Assays (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-5 Einzelversuchen in Duplikaten) von verschiedenen konfluenten nNOS-exprimierenden Zellen (A673, TGW-nu-I, HaCaT, NT-2, SK-N-MC) in 6-Loch Makroplatten. Nach 30minütiger Vorinkubation in 1 mM Arginin (schwarz) bzw. 1 mM Lysin (weiß) und 200 U/ml SOD wurden die zuvor 2 x mit LL gewaschenen Zellen für 2 mit 10  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 zur NO-Produktion stimuliert. Die Überstände wurden auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Messung des cGMP-Gehalts der RFL-6 Zellen erfolgte im RIA.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Substratversorgung endothelialer und neuronaler NO-Synthasen in verschiedenen Zelltypen. Im ersten Teil der Arbeit wurden intrazelluläre Argininquellen in primären Endothelzellen, in einer permanenten Endothel-Zelllinie sowie in einer nicht endothelialen Zelllinie, die mit eNOS stabil transfiziert worden war, untersucht. Da die intrazellulären Argininquellen zum Teil über bestimmte Aminosäuren mit dem Extrazellulärraum im Austausch standen, wurden weiterhin Transportsysteme, die für diesen Austausch verantwortlich sein könnten, gesucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde analog die Substratversorgung der neuronalen NOS in einer Neuroepithelium- und einer Neuroblastomzelllinie untersucht. Im Folgenden werden beide Abschnitte zunächst getrennt diskutiert und abschließend alle neuen Erkenntnisse zur Substratversorgung aus intrazellulären Arginin-Quellen und der Einfluss von methylierten Argininanaloga zusammengefasst.

### 4.1 Charakterisierung der Substratversorgung der endothelialen NO-Synthase

Die endotheliale NO-Synthase wurde in drei verschiedenen Zelltypen untersucht, eine zusammenfassende Hypothese der Substratversorgung aus den Ergebnissen ist in den Abbildungen 4.2 bis 4.4 graphisch dargestellt.

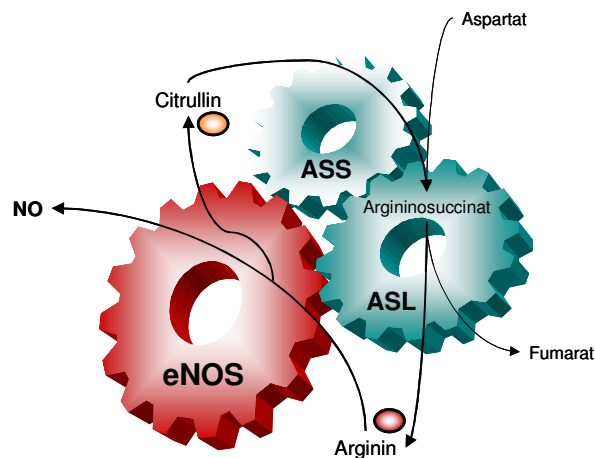
Aus den Studien bezüglich der Substratversorgung der endothelialen NO-Synthase können drei maßgebliche Schlüsse gezogen werden:

- Erstens gibt es in Endothelzellen, neben der mit dem extrazellulären Raum über Lysin im Austausch stehenden Arginin-Quelle, eine zweite Quelle, die für die eNOS zugänglich, aber nicht durch Substrate von System  $\gamma^+$ -Transportern austauschbar ist (Arginin-Quelle II). Dies konnte sowohl in primären Endothelzellen (HUVEC) als auch in von HUVEC's abstammenden Endothelzellen der permanenten Zelllinie EA.hy926 gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde die eNOS, die in der nicht-



endothelialen Zelllinie ECV304 exprimiert worden war, nach Lysin-Inkubation kaum noch mit Substrat versorgt, d.h. in diesem Zelltyp überwiegt die austauschbare Arginin-Quelle I. Die der eNOS-zugängliche Arginin-Quelle II scheint somit Zelltyp-spezifisch zu sein.

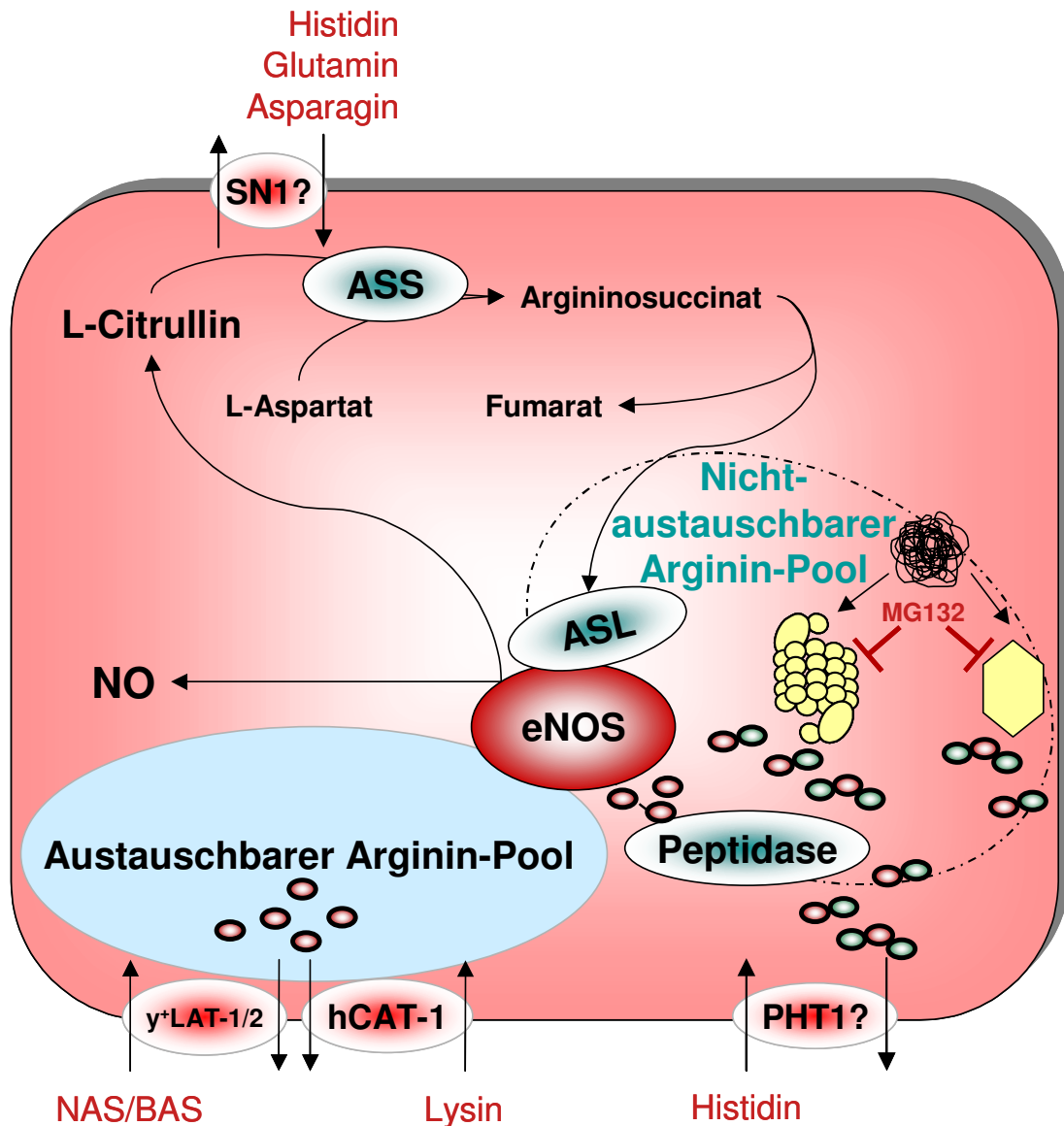
- Zweitens zeigten unsere Studien, dass ein Teil dieser Arginin-Quelle II aus dem Recycling des bei der NO-Synthese entstehenden Citrullins zurück zu Arginin besteht. Eine Ko-Lokalisation von eNOS, ASS und ASL in Caveoli (Solomonson et al., 2003) sowie in Aorten-Endothelzellen aus Schweinen (Flam et al., 2001) wurde bereits nachgewiesen. Die beiden Arbeiten postulierten einen separaten Arginin-Pool, der durch die zelluläre Ko-Lokalisation der Enzyme definiert ist und auf einer Weiterleitung des Substrates Arginin und eine dadurch funktionelle Assoziation zwischen NO-Synthese und Arginin-Regeneration beruht (Siehe Abb. 4.1).



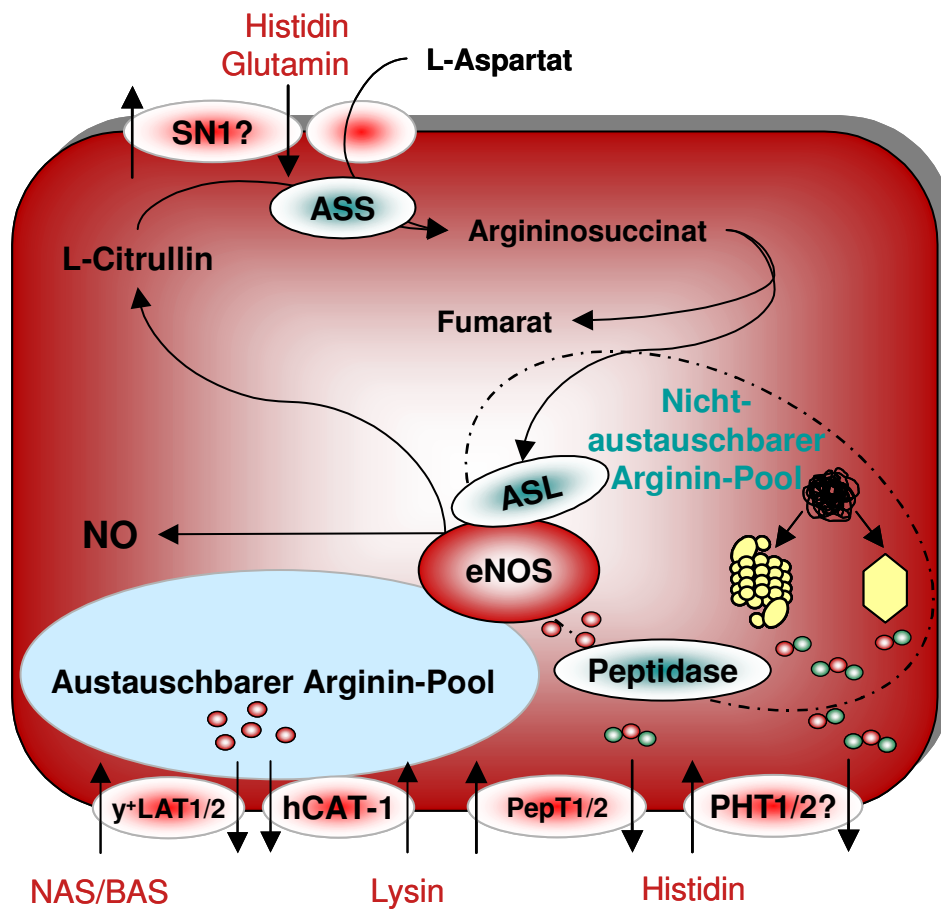
**Abbildung 4.1 Kopplungsmodell von endothelialer NO-Produktion und Regeneration des Substrates Arginin aus Citrullin (nach Solomonson et al., 2003).** Die Autoren postulieren eine Kopplung von eNOS, ASS und ASL in Caveoli, die unter unstimulierten Bedingungen „gelöst“ ist und nach Stimulation der NO-Produktion in Gang gesetzt wird, da das Recycling unter diesen Bedingungen ebenfalls co-stimuliert wird.

Der Recycling-Anteil der Arginin-Quelle II konnte in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von Citrullin gesteigert, hingegen durch Substrate des System N Transporters SN1 (Glutamin, Histidin und Asparagin) – und zwar ausschließlich durch diese - vermindert werden. Auffällig ist, dass in primären HUVEC im Gegensatz zu EA.hy926-Zellen Citrullin nur in Kombination mit extrazellulärem Aspartat (der zweiten für das Recycling notwendigen AS) die Reduktion der NO-Synthese aufheben konnte. Somit scheint in HUVEC Aspartat, das vermutlich aus Proteinabbau stammen müsste, ebenfalls limitierend zu sein.

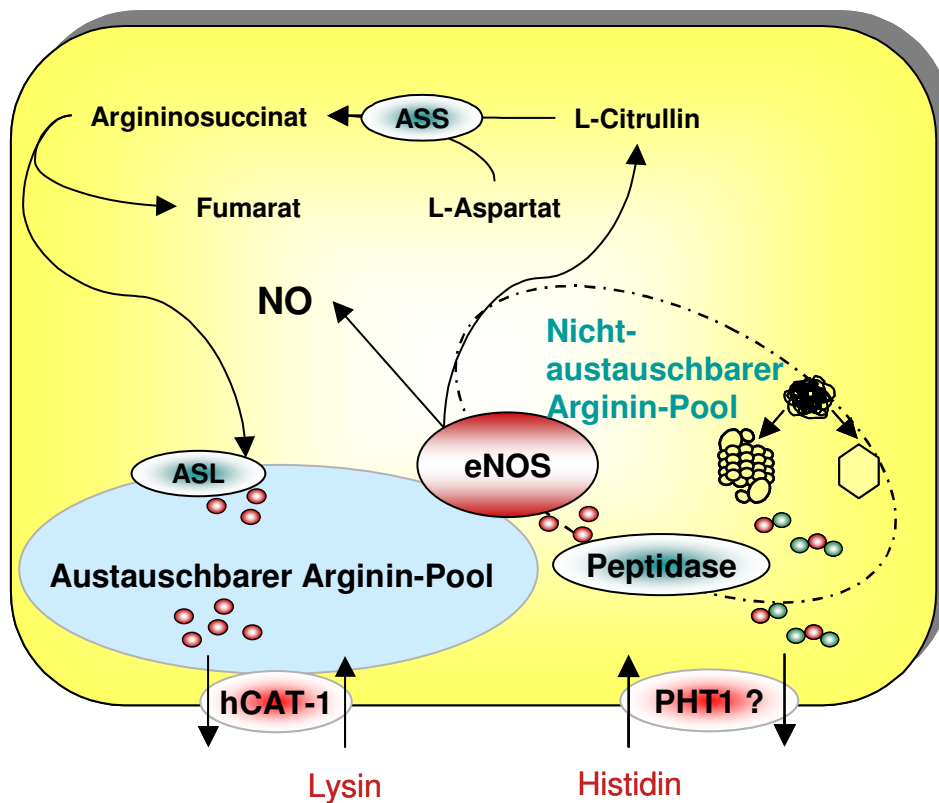
- Drittens ergaben meine Arbeiten, dass ein weiterer Teil der Arginin-Quelle II durch keine der getesteten kationischen oder neutralen Aminosäuren depletiert werden konnte. Lediglich der Proteasominhibitor MG132 (Lee et al., 1998) konnte die restliche endotheliale NO-Produktion vollständig hemmen. Dies bedeutet, dass dieses Arginin aus Proteinabbau bereitgestellt wird. Der endogene NOS-Inhibitor ADMA, der aus Proteolyse stammt, wird demnach vornehmlich in dieser Quelle akkumulieren.



**Abbildung 4.2 Hypothese der Substratversorgung der endothelialen NOS in EA.hy926 Endothelzellen.** Neben einer durch System  $\gamma^+$  (CAT-1)-Substrate austauschbaren Arginin-Quelle wird die eNOS in EA.hy926 Zellen von einer intrazellulären, nicht-austauschbaren Arginin-Quelle versorgt. Diese stammt sowohl aus dem Recycling des bei der NO-Synthese generierten Citrullins zurück zu Arginin als auch aus lysosomalem und proteasomalem Proteinabbau. Intrazelluläres Citrullin kann gegen Substrate des System N-Transporters SN1 ausgetauscht werden wodurch der Recyclingweg und die daraus resultierende NO-Synthese eingeschränkt werden. Argininhaltige Di- und Tripeptide aus Proteinabbau werden von einer bisher nicht-identifizierten Peptidase gespalten und das freigesetzte Arginin steht als eNOS-Substrat zur Verfügung. Vermutlich können die Peptide im Austausch gegen Histidin über den Peptid-Histidin-Transporter PHT1 depletiert und so dieser Teil der nicht-austauschbaren Arginin-Quelle eingeschränkt werden. Der Proteinabbau kann durch Einsatz des unspezifischen Inhibitors MG132 blockiert werden.



**Abbildung 4.3 Hypothese der Substratversorgung der endothelialen NOS in primären HUVEC.** Auch primäre HUVEC besitzen neben der austauschbaren eine weitere nicht-austauschbare Arginin-Quelle. Diese besteht analog zu EA.hy926 aus zwei Teilen, wobei der Recyclingweg aus Citrullin nur in Kombination mit supplementiertem Aspartat die Substratversorgung der eNOS bedienen kann. Über System N1-Substrate kann intrazelluläres Citrullin depletiert und der Recyclingweg eingeschränkt werden. Der zweite Teil rekrutiert sich wie bei EA.hy926-Zellen aus Proteinabbau, die entstehenden Peptide können vermutlich im Austausch gegen extrazelluläres Histidin aus der Zelle transportiert werden. HUVEC exprimieren zusätzlich zu den Peptid-Histidin-Transportern PHT1 und 2 die Peptid-Transporter PEPT1 und 2.



**Abbildung 4.4 Hypothese der Substratversorgung der eNOS in der nicht-endothelialen Zelllinie ECV304 (stabil transfizierte Zellen).** In ECV304 Zellen ist der Anteil an austauschbarem Arginin größer als in den beiden Endothelzelllinien. Der Recyclinganteil der nicht-austauschbaren Quelle beträgt etwa 10% von dem in EA.hy926. Dieser ist zudem nicht zugänglich für die in die ECV Zellen transfizierte eNOS. Eine Überexpression der Recyclingenzyme ASS und ASL in diesen Zellen könnte Auskunft darüber geben, ob der Anteil des aus Citrullin generierten Arginins bisher zu gering ist, oder ob wie vermutet keine Kopplung zwischen ASL und transfizierter eNOS besteht. Der System N-Transporter SN1 sowie die System  $\gamma^+$ -Transporter  $\gamma^+$ LAT1 und  $\gamma^+$ LAT2 werden in ECV304 nicht exprimiert. Die verbleibenden 20% NO-Restaktivität nach Lysin-Inkubation stammt scheinbar von Arginin aus Proteinabbau, Inhibitoren des Proteinabbaus wurden aber noch nicht experimentell eingesetzt. Ebenso wenig wurde bisher die Expression von Peptid-Transportern (PHT und PEPT) sowie der Einfluss von Histidin auf die NO-Produktion analysiert.

#### 4.1.1 Reduktion der eNOS-Aktivität durch Glutamin: Depletion der für das Recycling notwendigen Aminosäure Citrullin

Eine Reduktion der eNOS-Aktivität durch Glutamin wurde bereits in einer Reihe von *in vitro*- und *in vivo*-Studien aus Kaninchen-Aorten, Ratten-Hirngefäßen, Aorten- und venösen Endothelzellen aus Schweinen sowie humanen mikrovaskulären Endothelzellen beschrieben (Swierkosz et al., 1990; Okada et al., 2000; Hecker et al., 1990; Wu und Meininger 1993). Die Inhibition der NO-Produktion durch Glutamin scheint somit ein generelles Phänomen in Endothelzellen darzustellen. Andere Substrate des System N-Transporters SN1 wurden jedoch in den genannten Studien nicht untersucht. Die erste Hypothese, derzufolge Glutamin den ersten durch die Argininosuccinat-Synthase katalysierten Recyclingschritt hemmen soll (Sessa et al., 1990), wurde in späteren *in vitro*-Studien widerlegt, in denen Glutamin in endothelialen Zelllysaten keinen Einfluss auf die beiden aufeinanderfolgenden Recyclingschritte zeigte (Wu und Meininger, 1993). Dieses wurde durch unsere Ergebnisse bestätigt, da wir im Zelllysate ebenfalls keinen Einfluss von Glutamin auf das Recycling von Citrullin zu Arginin finden konnten.

Die Glutamin-vermittelte Inhibition der  $^{14}\text{C}$ -Arginin-Bildung aus extrazellulär angebotenem  $^{14}\text{C}$ -Citrullin einer früheren Studie (Sessa et al., 1990) könnte auf einer Inhibition des Einwärtstransportes von  $^{14}\text{C}$ -Citrullins durch Glutamin beruhen. Tatsächlich zeigten Wu und Meininger (Wu und Meininger, 1993), dass Glutamin mit der Citrullin-Aufnahme in Endothelzellen kompetieren kann. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass diese beiden Aminosäuren Substrate des gleichen Transporters sein könnten. Die beiden Autoren vermuteten später, dass Glutamin für eine inhibierende Wirkung zu Glucosamin metabolisiert werden müsse, wodurch die intrazelluläre Konzentration an NADPH, einem Co-Faktor der eNOS, vermindert würde (Wu et al., 2001). Unsere Beobachtung, dass Histidin eine ähnliche inhibierende Wirkung auf die NO-Synthese zeigt, widerspricht jedoch dieser Hypothese, da Histidin nicht dem gleichen Metabolismus unterliegt wie Glutamin. Zudem war die Glutamin- und Histidin-vermittelte Inhibition der eNOS in unseren Experimenten aufhebbar durch Arginin. Dies wäre nicht zu erwarten, wenn die Verfügbarkeit eines Co-Faktors der eNOS für ihre Aktivität limitierend gewesen wäre. Su und Block (Su und Block, 1995) fanden, dass erhöhte intrazelluläre Glutamin-Konzentrationen infolge einer anhaltenden Hypoxie (4-24 Stunden) die Aktivität der ASS in Schweine-Endothelzellen aus pulmonaren Arterien reduzieren konnte. Sie vermuteten deshalb, dass Glutamin einen Effekt auf die Stabilität der Recyclingenzyme hätte. Dies sollte jedoch in unseren

Experimenten, in denen die Zellen für kürzere Inkubationszeiten Glutamin und Histidin ausgesetzt waren, keine Rolle spielen.

Der Einfluss der SN1-Substrate auf die Arginin-Quelle II aus Recycling scheint daher wahrscheinlich auf dem Austausch dieser Substrate gegen intrazelluläres Citrullin zu basieren. Hierbei würde der Citrullin-Efflux beschleunigt, ein Effekt, der als Trans-Stimulation bezeichnet wird. Die Expression des SN1-Transporters in Endothelzellen sowie der gegenseitige Austausch von Citrullin und Glutamin, der in unseren HPLC-Experimenten gezeigt wurde, unterstreicht unsere Hypothese. Daher nehmen wir an, dass eher extrazelluläres als intrazelluläres Glutamin eine inhibierende Wirkung auf das Recycling vermittelt. Wie kann aber die verminderte eNOS-Aktivität während der 30-minütigen Inkubation in Lysin (ohne Glutamin) erklärt werden? Wir konnten zeigen, dass Glutamin aus den Zellen (die aufgrund der hohen Glutamin-Konzentration im Zellkultur-Medium hohe intrazelluläre Glutamin-Konzentrationen aufwiesen) im extrazellulären Puffer angereichert wurde. Bereits nach 30 Minuten Inkubation in 1 mM Lysin fand sich nur noch etwa 20% des Glutamins intrazellulär. Dieses ausgeflossene Glutamin könnte als Trans-Stimulator für intrazelluläres Citrullin gedient haben (Daten nicht gezeigt). Die Arbeitsgruppe um Stefan Broer (2004) fand jedoch, dass der SN1 zumindest mit intrazellulärem Glutamin nicht trans-stimulierbar ist. In Ratte, Maus und Mensch wurde der SN1-Transporter bisher lediglich als Influx- und Efflux-Transporter mit einer hohen Affinität für die proteinogenen Aminosäuren Glutamin und Histidin sowie einer geringen Affinität für Asparagin beschrieben (Chaudhry et al., 1999; Fei et al., 2000). Dieses Substratprofil passt ausgezeichnet zu dem Inhibitionsprofil in unseren Experimenten. Es unterscheidet sich von allen anderen bekannten Glutamin-Transportern (inklusive SN2, der außerdem Serin transportiert). Obwohl eine moderate Transport-Aktivität von SN1 für Alanin in allen drei Spezies beschrieben wurde, konnte ein Effekt von Alanin auf die NO-Produktion in unseren Versuchen nicht gezeigt werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Sensitivität in unseren Experimenten nicht ausreichte, um diese Aktivität zu detektieren. Eine weitere Tatsache ist, dass Citrullin zwar bisher nicht als Substrat für SN1 beschrieben wurde, aufgrund der freien Aminogruppe in der Seitenkette würde es jedoch in das bekannte Substratspektrum des Transporters passen. Transportstudien mit überexprimiertem SN1 sind künftig durchzuführen, um zu beweisen, dass Citrullin tatsächlich ein Substrat für den Transporter SN1 ist und dass der SN1-vermittelte Citrullin-Transport trans-stimulierbar ist.

Andere Glutamin-Transportsysteme (vergleiche Tabelle 3.1) kommen für den Austausch von Citrullin nicht in Frage, da die von ihnen zusätzlich transportierten AS wie zum Beispiel Leucin, Alanin, Serin oder Threonin keinen Einfluss auf die NO-Synthese in Endothelzellen hatten.

### **4.1.2 Proteinabbau als zweite intrazelluläre Argininquelle**

Nachdem geklärt werden konnte, dass ein Teil der nicht-austauschbaren Argininquelle in Endothelzellen aus dem Recycling von Citrullin zu Arginin besteht und dieser Teil depletiert werden kann, stellte sich die Frage, wie die unter Lysin und Glutamin-Inkubation verbleibende eNOS-Aktivität von 30-50% zu erklären war. Hinzu kam die Beobachtung, dass Histidin eine etwas stärkere Reduktion der NO-Synthese bewirkte, was auf einen zusätzlichen Effekt von Histidin gegenüber Glutamin schließen lässt. Hierzu wurden die EA.hy926-Zellen zusätzlich zu Lysin und Glutamin mit einem Inhibitor des Proteinabbaus, MG132 inkubiert, worauf tatsächlich keine restliche NOS-Aktivität mehr vorhanden war. Da sowohl beim proteasomalen als auch beim lysosomalen Proteinabbau zunächst Di- und Tripeptide entstehen, müssen diese von einer Peptidase gespalten werden, bevor in den Peptiden enthaltenes Arginin als Substrat für die eNOS zur Verfügung steht.

#### **4.1.2.1 Einschränkung der intrazellulären Substratquelle aus Proteinabbau durch Depletion der Peptide?**

Unsere Annahme geht dahin, dass die aus Proteinabbau stammenden Peptide über einen Peptid-Transporter aus der Zelle herausgebracht werden konnten und so das Substrat für die NO-Synthese reduzierten. Dieser Effekt müsste weiterhin von Histidin vermittelt werden, da sich diese Aminosäure in gleichem Ausmaß wie ein Proteinabbau-Inhibitor auf die NO-Produktion negativ auswirkte. Kandidat für einen solchen Mechanismus ist nach dem heutigen Stand der Forschung lediglich einer der Peptid-Histidin-Transporter (PHT). Problematisch ist allerdings, dass bisher sehr wenig über die PHT-Familie bekannt ist. Nach unserer Hypothese müsste der PHT1-Transporter den Austausch von extrazellulärem Histidin gegen intrazelluläre Peptide vermitteln, allerdings ist noch nicht klar, welche Di- und Tripeptide zum Substratspektrum des Transporters zählen und ob er überhaupt in einem Austausch-Modus transportieren kann. Für rekombinanten rPHT2, der in Liposomen rekonstituiert wurde, ist publiziert, dass er einen Histidin- und Carnosin-Influx bewirkt, wenn die Liposomen mit Histidin oder dem Dipeptid Histidin-Leucin, nicht aber mit Glycin beladen wurden (Sakata et al., 2001).



Da in der Endothelzelllinie EA.hy926 im Gegensatz zu primären HUVEC nur PHT1, nicht aber das zweite Mitglied der PHT-Familie PHT2 exprimiert wurde, sollte dieser für den von uns postulierten Austausch verantwortlich sein.

PHT2 aus Ratte scheint in Lysosomen den Auswärtstransport von Peptiden aus lysosomalem Abbau ins Cytosol zu vermitteln. PHT2 war nicht in der Plasmamembran lokalisiert (Sakata et al., 2001). PHT1 aus Ratte ist dagegen in der Plasmamembran nachgewiesen worden (Yamashita et al., 1997). Ist nun der humane PHT1 ein lysosomaler oder ein Plasmamembran-Transporter? Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass er sich in der Plasmamembran befindet, da im Falle einer lysosomalen Expression die Peptide durch PHT1 ins Cytosol gebracht würden und nach Spaltung durch eine Peptidase könnte Arginin dort als NOS-Substrat zur Verfügung stehen. Analog zu PEPT1 besteht auch für die PHT-Isoformen die Möglichkeit, dass sie in verschiedenen Zelltypen sowohl in der Plasmamembran als auch intrazellulär lokalisiert sein könnten (Herrera-Ruiz und Knipp, 2002). Auch für das PAT1-Protein ist sowohl eine Expression in Lysosomen (in Neuronen des Gehirns) als auch in der apikalen Membran von Darmepithelzellen nachgewiesen worden. In letzterer vermittelt PAT1 die Absorption von AS, die aus luminaler Proteinspaltung stammen (Boll, Daniel und Gasnier, 2004).

Die beiden anderen Transporter der SLC15-Familie, PEPT1 und PEPT2, die wir in HUVEC exprimiert fanden, wären keine Kandidaten für einen Austausch mit Histidin, da sie freies Histidin als Substrat nicht akzeptieren (Daniel und Kottra, 2004).

### **4.1.3 Ist eine Kolokalisation der Arginin-generierenden Enzyme und eNOS notwendig, um die Substratversorgung zu garantieren?**

Für die beiden intrazellulären Arginin-Quellen (II) aus Recycling und Proteinabbau kann nun postuliert werden, dass die Arginin-generierenden Enzyme in unmittelbarer Nähe zur eNOS lokalisiert sein müssten, da das generierte Arginin nicht gegen extrazelluläres Lysin ausgetauscht werden kann.

Nach früheren Daten, die zeigen, dass CAT-1 und 4F2hc/ $\gamma^+$ LAT2 präsent sind (Gräf et al., 2001; Sala et al., 2002), konnte in dieser Arbeit durch erste quantitative RT-PCR-Experimente auch eine vergleichbare Expression von CAT-1 und  $\gamma^+$ LAT1 in EA.hy926 gezeigt werden,  $\gamma^+$ LAT2 hingegen wurde nur zu einem Zehntel im Vergleich zu ersteren exprimiert. Auch in primären HUVEC war CAT-1 der prominentere Transporter gegenüber  $\gamma^+$ LAT1 und  $\gamma^+$ LAT2.

Die etwa 20%-ige NOS-Restaktivität nach Lysin-Inkubation in mit eNOS transfizierten ECV304 Zellen stammte vermutlich aus Proteinabbau, da das wenige recycelte Arginin scheinbar nicht zur NO-Synthese genutzt werden konnte. Versuche hierzu müssen künftig jedoch noch durchgeführt werden, um diese Fragestellung endgültig zu klären. Die weitaus geringer ausgeprägte zweite Arginin-Quelle in ECV304 N-III-2 Zellen könnte durch die fehlende Ko-Lokalisation der Enzyme zur eNOS zu erklären sein. Durch die Messung von intrazellulärem freien Arginin mittels HPLC unter Lysin-Inkubation sollte festgestellt werden können, ob in ECV304-Zellen geringere intrazelluläre Argininkonzentrationen als in EA.hy-Zellen messbar sind. Wäre in beiden Zelltypen die gleiche Argininkonzentration vorhanden, könnten die Unterschiede in der Substratversorgung der eNOS nur dadurch zu erklären sein, dass die direkte Weiterleitung dieses Arginins zur eNOS in ECV304-Zellen nicht statt findet.

Die heterologe Expression von eNOS in verschiedenen nicht-endothelialen Zelltypen könnte wichtige Hinweise bezüglich der Arginin-Generierung und deren Kopplungsmechanismen ergeben.

#### 4.1.4 Schlussfolgernde Darstellung der Substratversorgung der eNOS

Unsere Experimente demonstrierten, dass die Substratversorgung der eNOS nicht ausschließlich von der Aktivität der Transporter für kationische Aminosäure-Transporter wie CAT-1 oder 4F2hc/y<sup>+</sup>LAT abhängig ist, sondern außerdem von einem Transporter für neutrale Aminosäuren, wahrscheinlich SN1, und möglicherweise einem Transporter für Di- und Tripeptide, PHT1. Der jeweilige Beitrag der verschiedenen Arginin-Quellen zur Substratversorgung der eNOS ist daher abhängig von dem Anteil an Aminosäuren und Peptiden in der extrazellulären Flüssigkeit. Es muss weiterhin geklärt werden, welche der Arginin-Quellen unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen von der eNOS genutzt wird. Außerdem ist denkbar, dass der Phosphorylierungszustand der eNOS, ihre Assoziation mit anderen Proteinen oder ihre subzelluläre Lokalisation den Zugriff der eNOS auf die verschiedenen Quellen beeinflusst.

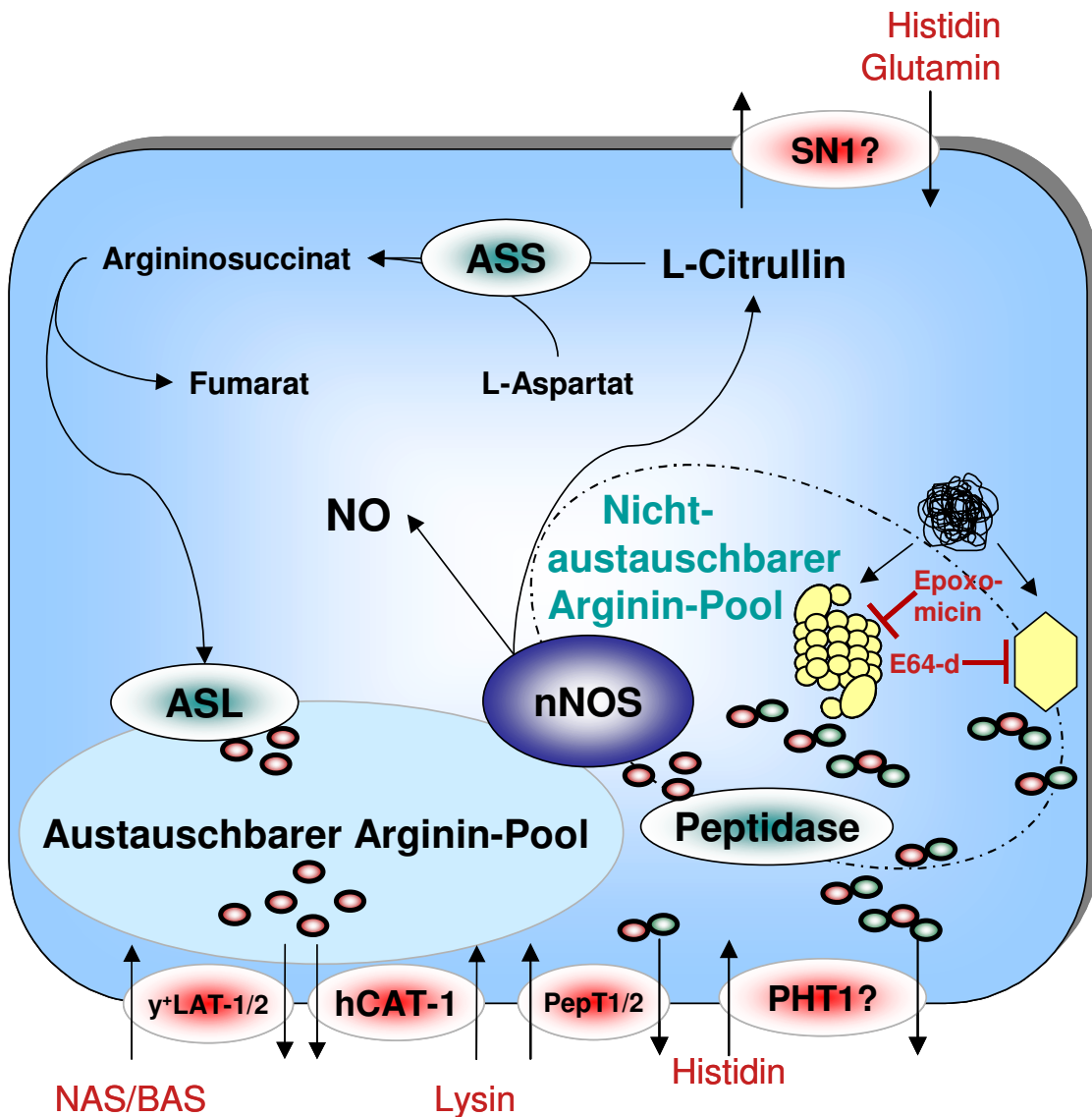
## 4.2 Charakterisierung der Substratversorgung der neuronalen NO-Synthese

Von der nNOS generiertes NO wirkt toxisch, wenn es in zu großen Mengen produziert wird. Daher könnte in neuronalen Zellen die Regulation zur NO-Generation durch die Versorgung mit Arginin von großer Bedeutung für die Balance zwischen normalen und pathophysiologischen Zuständen sein. Da aufgrund der fehlenden Expression der Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS I) und Ornithin-Carbamoyltransferase (OCT) keine de novo-Synthese von Arginin im Gehirn stattfindet, benötigen Gehirnzellen Arginin entweder aus Proteinabbau oder aus dem Blut, von dem es durch die Blut-Hirn-Schranke durch spezifische Transporter und von Zelle zu Zelle transferiert wird (Malandro und Kilberg, 1996). Arginin kann außerdem auch aus dem bei der NO-Synthese entstehenden Citrullin durch die Enzyme ASS und ASL regeneriert werden. Unter Berücksichtigung der möglicherweise unterschiedlichen Substratversorgung in verschiedenen neuronalen Zelltypen wurden in dieser Arbeit sowohl A673 Neuroepitheliomzellen (Giard et al., 1973) als auch TGW-nu-I Neuroblastomzellen (Tsuchida et al., 1990) charakterisiert.

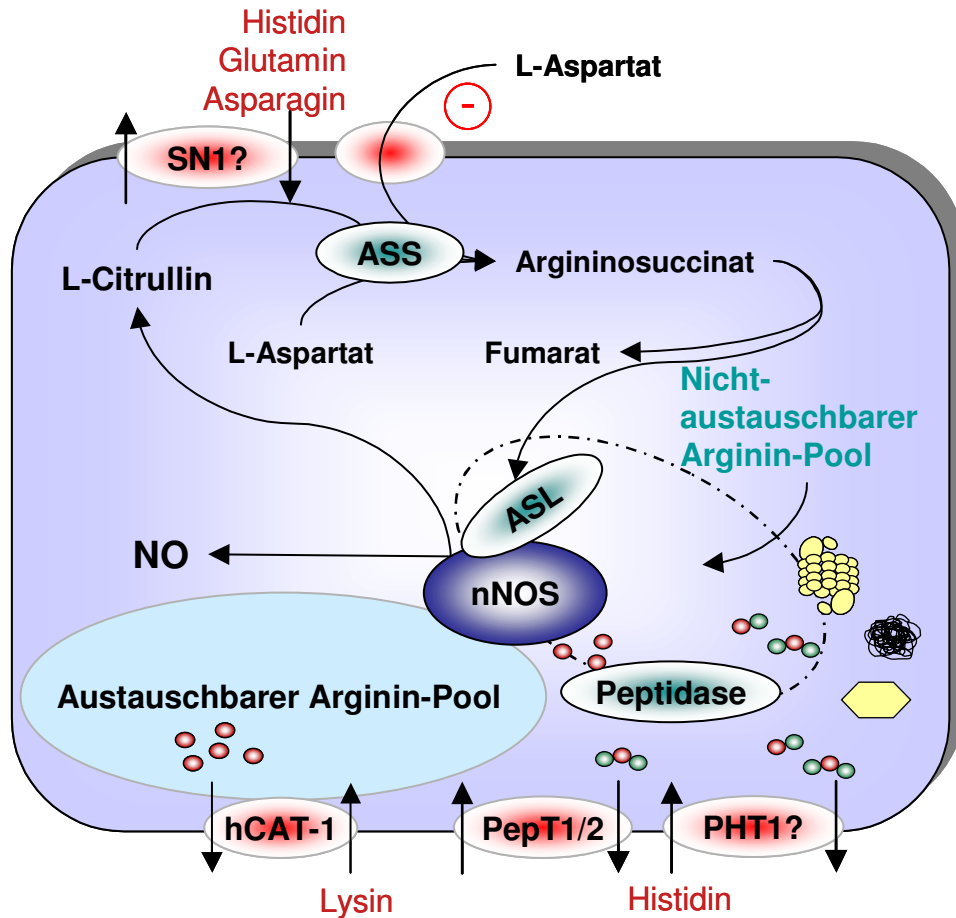
Aus den Studien zur Substratversorgung der neuronalen NO-Synthese konnten die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden:

- Erstens gibt es auch in neuronalen Zelltypen, neben der über System  $y^+$ -Substrate im Austausch stehenden Arginin-Quelle, eine weitere Quelle, die zugänglich für die nNOS, aber nicht über BAS austauschbar ist. Auch in den untersuchten neuronalen Zellen ist hCAT-1 der dominante System  $y^+$ -Transporter.
- Zweitens besitzen auch neuronale Zellen, analog zu Endothelzellen, die Fähigkeit, das bei der NO-Synthese generierte Citrullin zurück zu Arginin zu recyceln. Die Nutzung dieses Arginins als Substrat zur NO-Synthese hängt jedoch vom Zelltyp ab, was darauf schließen lässt, dass eine Kopplung der Recyclingenzyme zur nNOS Voraussetzung sein müsste.
- Drittens können beide neuronalen Zelltypen, ebenso wie Endothelzellen, Arginin aus Proteinabbau zur Substratversorgung der nNOS bereitstellen.

Eine zusammenfassende Hypothese der Substratversorgung der neuronalen NOS in beiden Zelltypen ist in den Abbildungen 4.5 und 4.6 graphisch dargestellt.



**Abbildung 4.5 Hypothese der Substratversorgung der neuronalen NOS in A673 Neuroepitheliumzellen.** A673 Neuroepitheliumzellen besitzen eine durch System  $\gamma^+$ -Substrate austauschbare Arginin-Quelle sowie eine weitere, nicht-austauschbare. Diese unterscheidet sich maßgeblich von der in Endothelzellen: Trotz eines Recyclings des bei der NO-Synthese gebildeten Citrullins zu Arginin kann die neuronale NOS dieses nicht als Substrat verwerten, da es über CAT-1 depletiert werden kann. Der Recyclingweg kann trotzdem durch einen SN1-bedingten Citrullin-Glutamin-Austausch eingeschränkt werden. Die der nNOS zur Verfügung stehende nicht-austauschbare Arginin-Quelle setzt sich aus lysosomalem und proteasomalen Proteinabbau zusammen. Die argininhaltigen Di- und Tripeptide müssen durch Peptidspaltung in ihre Aminosäurebestandteile zerlegt werden, bevor Arginin als NOS-Substrat zur Verfügung steht. Über den Peptid-Histidin-Transporter PHT1 können die Peptide depletiert und die NO-Synthese eingeschränkt werden. A673 exprimieren außerdem die Peptidtransporter PEPT1 und 2.



**Abbildung 4.6 Hypothese der Substratversorgung der neuronalen NOS in TGW-nu-I Neuroblastomzellen.** Die nNOS in TGW-nu-I Neuroblastomzellen wird sowohl durch eine austauschbare als auch eine nicht-austauschbare Arginin-Quelle versorgt. Letztere besteht im Unterschied zu A673 Neuroepitheliumzellen sowohl aus dem Recycling von Citrullin zu Arginin, als auch aus Proteinabbau. Durch eine 5-fach stärkere Expression von SN1 als in Endothelzellen kommt es zu keinem zusätzlichen Einfluss von extrazellulärem Glutamin auf die NO-Synthese, da vermutlich bereits aus der Zelle fließendes Glutamin ausreichend ist, um Citrullin zu depletieren. Der Recyclingweg wird zusätzlich durch Aspartat inhibiert, was möglicherweise auf eine Modifikation des SN1-Transportmechanismus zurückzuführen ist. Der aus Proteinabbau stammende Substratanteil kann durch PHT1 gegen Histidin depletiert werden. TGW-nu-I exprimieren außerdem die Peptidtransporter PEPT1 und 2, die Expression der System  $\gamma^+$ L-Transporter wurde bisher noch nicht untersucht.

#### 4.2.1 Die Bereitstellung des Substrates Arginin aus dem Recyclingweg zur Synthese von nNOS-generiertem NO ist abhängig vom Zelltyp

Auch in nNOS-exprimierenden A673 Neuroepitheliumzellen fanden wir neben dem mit dem Extrazellulärraum austauschbaren Arginin eine Arginin-Quelle, die nicht mit extrazellulären basischen Aminosäuren im Austausch stand. Diese war weder durch Glutamin hemmbar, noch durch Citrullin auffüllbar. Recycling spielte daher in diesen Zellen wahrscheinlich keine Rolle für die Substratversorgung der nNOS. A673 Zellen konnten zwar Citrullin zu Arginin umsetzen, jedoch wurde das entstandene Arginin vermutlich über System  $\gamma^+$  aus den Zellen transportiert. In HPLC-Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass Glutamin die intrazellulären Citrullinkonzentrationen reduzierte. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass analog zu Endothelzellen ein Austausch von extrazellulärem Glutamin gegen intrazelluläres Citrullin stattfindet. Der putative Transporter für diese Reaktion, SN1, konnte auch in den Neuroepitheliumzellen nachgewiesen werden.

TGW-nu-I Zellen konnten dagegen aus Citrullin regeneriertes Arginin zur NO-Synthese nutzen, allerdings nicht in Kombination mit Aspartat. Wie konnte extrazelluläres Aspartat diese Reaktion negativ beeinflussen? Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass intrazelluläres Glutamat in Astrozyten die kinetischen Eigenschaften des System N Transporters SN1 verändert: Es erhöht die Kapazität von Astrozyten, Glutamin freizusetzen, entweder direkt durch Erhöhung der  $V_{\max}$  von SN1 oder indirekt durch die Erniedrigung der Substrat-Affinität. D-Glutamat, D-Aspartat, Alanin oder Leucin zeigten keinen Effekt, jedoch konnte der Glutamin-Transport auch durch L-Aspartat gesteigert werden (Broer et al., 2004). Demnach könnte das extrazellulär angebotene Aspartat, nachdem es in die TGW-nu-I Zellen transportiert wurde, intrazellulär als Signalmolekül wirken und so beispielsweise den Export von Citrullin steigern bzw. den Import verhindern und so ein Recycling zu Arginin unterbinden.

Schwer interpretierbar ist das Resultat, dass Glutamin trotz Expression des putativen Citrullin-Glutamin-Austauschers SN1 keinen Einfluss auf die NO-Produktion in TGW-nu-I-Zellen hat. Da jedoch die Reduktion der NO-Synthese unter 30-minütiger Lysin-Inkubation in TGW-nu-I deutlich stärker ausfällt, als in Endothelzellen (25 vs. 50-60%), besteht die Möglichkeit, dass es zu keinem zusätzlichen Effekt von Glutamin mehr kommen kann. In Endothelzellen sinkt die eNOS-Aktivität bei 30 Minuten Inkubation in Lysin plus Glutamin ebenfalls auf 25%, in TGW-nu-I-Zellen wurde jedoch der SN1-Transporter 5 fach stärker

exprimiert und so könnte intrazelluläres Citrullin schneller depletiert worden sein. Künftig folgende HPLC-Experimente mit TGW-nu-I sollten die Verhältnisse zwischen intra- und extrazellulärem Glutamin und Citrullin aufklären können.

Bereits 1960 wurde die enzymatische Aktivität von ASS und ASL im ZNS nachgewiesen (Ratner et al., 1960). Später konnten ASS immunhistochemisch in spezifischen Neuronen und ASL in spezifischen Glia-Subtypen des Kleinhirn und Neuronen im ganzen Hirn identifiziert werden (Arnt-Ramos et al., 1992; Nakamura et al., 1990 und 1991). Eine Reihe von Arbeiten zeigen eine Ko-Lokalisation von nNOS, ASS und ASL z. B. in neuronalen Zellkörpern in Ganglien vom Schwein (Yu et al., 1997), in Neuronen und Nervenfasern im Gastrointestinaltrakt von Hunden (Daniel et al., 2002) und Neuronen im Magenfundus von Ratten (Van Geldre et al., 2002). Außerdem ist bekannt, dass enterale Neurone (Shuttleworth et al., 1995) sowie Neurone perivaskulärer Nerven der cerebralen Arterie (Chen und Lee, 1995) Citrullin zu Arginin recyceln können.

Es wurde bereits gezeigt, dass Citrullin die durch NOS-Inhibitoren vermittelte Hemmung neurogener Vasodilatation in isolierten Venen aufheben kann (Yu et al., 1997). In der Arbeit von Van Geldre et al. (2002) wurde weiter beschrieben, dass Glutamin die Citrullin-vermittelte Aufhebung der L-NAME induzierten Inhibition der nitrogenen Relaxationen reduziert. Dieser Effekt wurde auf die Hemmung der Citrullin-Aufnahme durch Glutamin zurückgeführt. Braissant et al. (1999) zog aus seiner in situ-Hybridisierungsstudie den Schluss, dass Neurone, die zwar die Recyclingenzyme, nicht aber die nNOS exprimierten, für das Recycling von Citrullin zu Arginin verantwortlich sind. Daher muss es einen Citrullin- und Arginin-Transport zwischen den Zellen geben. Arginin-Transport erfolgt in Neuronen überwiegend via System  $\gamma^+$  (Übersicht: Wiesinger, 2001), der Transport von Citrullin in neuronalen Zellkulturen durch System L, wobei es dabei zu einer Konkurrenz mit verschiedenen System L-Substraten wie Histidin, Glutamin oder BCH kommt. Durch das breite Substratspektrum von System L ist jedoch die effektive Nutzung von extrazellulärem Citrullin zur Generation von NO abhängig von der Konzentration aller NAS. System L erlaubt die Passage von Citrullin in beide Richtungen, abhängig vom Konzentrationsgradienten (Schmidlin et al., 2000).



#### 4.2.2 Proteinabbau als intrazelluläre Argininquelle zur Substratversorgung in nNOS exprimierenden Zellen

Analog zu Endothelzellen konnten wir zeigen, dass das Arginin zur NO-Synthese in A673 Neuroepitheliumzellen aus Proteinabbau stammt und die Substratversorgung aus dieser Quelle über mindestens vier Stunden aufrechterhalten werden kann. Die Verfügbarkeit dieser Arginin-Quelle ist für die nNOS in A673-Zellen von besonderer Bedeutung, da sie die einzige intrazelluläre Quelle darstellt. Die Substratversorgung aus Proteinabbau hängt daher vom Methylierungsstatus der abgebauten Proteine ab, da auch methylierte Arginine wie ADMA aus Proteinabbau stammen.

Es stellte sich weiter die Frage, ob das Arginin aus dem proteasomalen oder lysosomalen Proteinabbau stammte. Durch die Resultate mit spezifischen Inhibitoren der proteasomalen und lysosomalen Proteindegradation wurde gezeigt, dass Arginin aus beiden Quellen stammen kann. Die Blockade von jeweils einem der beiden Abbauewege konnte durch den anderen kompensiert werden. Erst wenn beide gehemmt wurden, zeigten sich Auswirkungen auf die NO-Synthese.

Histidin führte in A673 Zellen zur gleichen Reduktion der NO-Synthese wie der Einsatz des Proteinabbau-Inhibitors MG132 und hemmte auch in TGW-nu-I-Zellen die unter Lysin-Inkubation verbleibende nNOS-Aktivität vollständig. Da in beiden Zelltypen der Peptid-Histidin-Transporter PHT1 exprimiert wurde, konnte postuliert werden, dass im Austausch gegen extrazelluläres Histidin die intrazellulären Peptide depletiert werden. Dies führte dann konsequenterweise zur Reduktion der NO-Produktion.

Die intrazelluläre Arginin-Quelle aus Proteinabbau schien in TGW-nu-I Neuroblastomzellen kleiner zu sein als in A673 Neuroepitheliumzellen (25% TGW-nu-I vs. 50% A673). Ob in TGW-nu-I weniger Proteine degradiert werden oder Arginin aus Proteinabbau zum Teil in die austauschbare Quelle gelangen kann, muss noch durch HPLC-Experimente geklärt werden. Des Weiteren wurden in TGW-nu-I Zellen bisher noch nicht die spezifischen proteasomalen und lysosomalen Inhibitoren getestet, unter Umständen könnte diesem Zelltyp nur einer der beiden Abbauewege zur Arginin-Bereitstellung zur Verfügung stehen.

### 4.2.3 Optimierung der NO-Synthese in nNOS-exprimierenden Zellen

Durch trans-Retinsäure induzierte neuronale Differenzierung führt zu einer Induktion der nNOS-Expression in TGW-nu-I (Ogura et al., 1996). BH<sub>4</sub> gilt als limitierend für die NO-Synthese in diesem Zelltyp, da extrazelluläres BH<sub>4</sub>, das von TGW-nu-I aufgenommen wird dort zu einer 100 fachen Steigerung der NO-Produktion führt. Welches Transportsystem BH<sub>4</sub> verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt. Die Aufnahme konnte allerdings durch Erhöhung der Temperatur oder der Glucose-Konzentration nicht gesteigert werden (Choi et al., 2003). Die Substratversorgung der nNOS unter Supplementation von BH<sub>4</sub> könnte sich von der in unseren Versuchsansätzen unterscheiden. Eine verstärkte NO-Synthese nach neuronaler Differenzierung und mit optimaler BH<sub>4</sub>-Versorgung muss auch eine verstärkte Substratversorgung mit sich führen, da es unter Substratmangel zu einer Entkopplung der nNOS-Reaktion und dadurch bedingte Superoxid-Bildung kommen kann.

Aus einer Veröffentlichung einer Arbeitsgruppe unseres Institutes geht hervor, dass die Steigerung des bioaktiven NOs in db-cAMP behandelten A673 Zellen nur unter Zugabe von 100 µM Sepiapterin erreicht werden konnte (Boissel et al., 2004, Biochemistry). Daher besteht die Möglichkeit, die weiteren nNOS-exprimierenden Zellen HaCaT, NT-2, SK-N-MC und NB-OK-I in Gegenwart von Sepiapterin erneut nach db-cAMP-Behandlung auf ihre NOS-Aktivität zu untersuchen, um im Erfolgsfall eine breitere Palette nNOS-exprimierender Zellen auf ihre möglicherweise unterschiedliche Substratversorgung zu charakterisieren.

### 4.2.4 Schlussfolgernde Darstellung der Substratversorgung der nNOS

Die Substratversorgung in nNOS-exprimierenden Zellen scheint stark vom Zelltyp abhängig zu sein. Insbesondere die Arginin-Bereitstellung aus dem Recyclingweg ist variabel: trotz Expression der neuronalen NOS als auch der Recyclingenzyme ASS und ASL, konnten nur TGW-nu-I Neuroblastomzellen, nicht aber A673 Neuroepitheliomzellen das regenerierte Arginin zur NO-Synthese nutzen. Zur Nutzung des Arginins aus dem Recycling schien eine direkte Weiterleitung des Arginins von den Recyclingenzymen zur NOS notwendig zu sein, da andernfalls Arginin über Transportsysteme wie  $\gamma^+$  depletiert werden konnte. Die intrazelluläre Arginin-Quelle aus Proteinabbau hingegen schien unabhängig vom Zelltyp in allen untersuchten Zellen für die NOS zugänglich zu sein.

## 4.3 Einfluss von endogenen Methylargininen auf die NO-Synthese

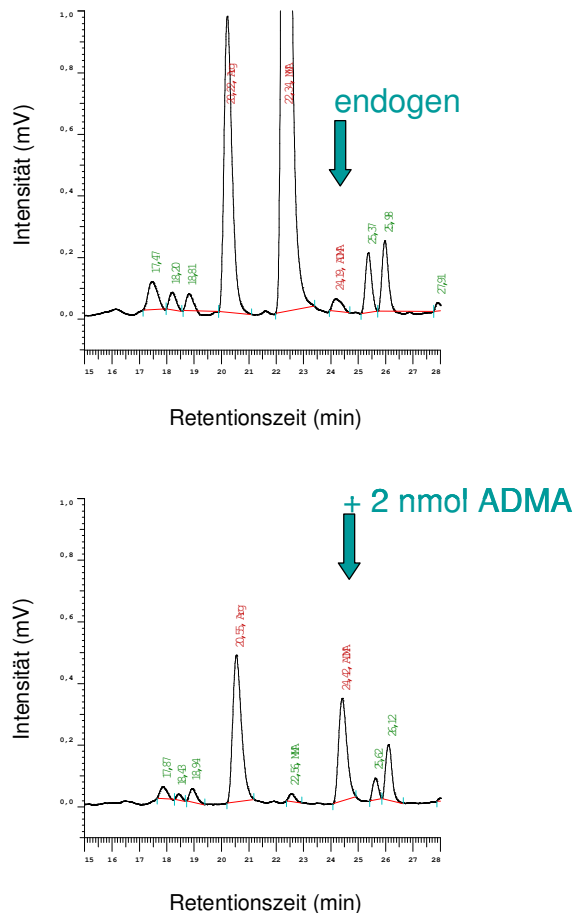
### 4.3.1 Einfluss von endogenen Methylargininen auf NO-Synthasen

Zum Einfluss von endogenen Methylargininen auf die neuronale NOS ist bisher nicht viel bekannt. Eine aktuelle Studie von Cardounel et al. (2005) beschreibt den Einfluss von ADMA und NMMA auf die der NO- und Superoxid-Produktion der nNOS. Unter der Depletion des Substrates Arginin und dem Ko-Faktor BH<sub>4</sub> generiert die nNOS Superoxid-Radikale (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), bei der die Elektronen von NADPH auf den molekularen Sauerstoff übertragen wurden. Dies bezeichnet man als Entkopplung des Enzyms. Auch unter physiologischen Substrat- und Ko-Faktor-Konzentrationen wurde eine Superoxid-Bildung beobachtet, die etwa 20% der des depletierten Enzyms beträgt. Unter Argininmangel inhibierte ADMA ab einer Konzentration von 1 µM die Superoxid-Bildung durch nNOS um ca. 60%. Die Autoren vermuten, dass die Bindung von ADMA an die nNOS den Zugang von Sauerstoff an das Häm zum Teil verhindern kann: Die Methylgruppen des ADMA scheinen nahe an der O<sub>2</sub>-Bindungsstelle im Häm-Zentrum zu sein. Das Monomethyl-Arginin NMMA zeigt dagegen keinen Effekt auf die O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Bildung unter Argininmangel. Arginin selbst vermindert die Superoxid-Produktion. Die Situation ändert sich unter Depletion des Ko-Faktors BH<sub>4</sub>, ADMA hatte unter diesen Umständen keinen Effekt mehr während NMMA die O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Bildung verdreifachte. Die Autoren konnten feststellen, dass die Superoxid-Generation unter BH<sub>4</sub>-Mangel –auch bei physiologischen Arginin-Konzentrationen- am ausgeprägtesten ist und keine NO-Synthese mehr stattfand. Dies schien auf allosterische Interaktionen zwischen Arginin und BH<sub>4</sub> zurückzuführen zu sein. Die BH<sub>4</sub>-Bindung an nNOS moduliert die Substratbindung von Arginin und ADMA und somit ihre relative Position zur Häm-Bindungsstelle. Die Bindung von NMMA an die BH<sub>4</sub>-depletierte nNOS schien hingegen den gesamten Elektronentransfer auf Sauerstoff zu erleichtern. Die Produktion von Superoxid fand scheinbar im Häm-Zentrum statt, da sie zu über 90% durch Imidazol inhibierbar war.

Die Kenntnisse zur Wirkung von ADMA auf die endotheliale NOS ist weitaus umfangreicher. Es gibt experimentelle und klinische Befunde zur Verbindung von endothelialer Dysfunktion und der erhöhten Produktion von Sauerstoff-Radikalen. Es wurde gezeigt, dass oxidativer Stress die Arginin-Methylierung steigert, was zu erhöhten ADMA-Spiegeln im Plasma führt. Auch die eNOS scheint bei hohen ADMA-Konzentrationen zu entkoppeln (Übersicht: Sydow und Münzel, 2003).



Recyclingweges durch Glutamin sollte dies zu einer Reduktion der NOS-Aktivität führen, die durch Gabe von extrazellulärem Arginin wieder aufgehoben werden müsste. Die manipulierten intrazellulären ADMA-Spiegel könnten mit Hilfe von HPLC-Analysen nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Bestimmung von Arginin und ADMA in der HPLC kann erfolgen, nachdem die basischen AS aus dem Zelllysate über polymere Kationen-Austauscher-Säulen (Waters, Eschborn) extrahiert wurden (Teerlink et al., 2002; Abb. 4.7).



**Abbildung 4.8 ADMA-Nachweis in EA.hy926-Zellen durch HPLC.** Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach einem alternativen Protokoll zu den bisher im Ergebnisteil präsentierten HPLC-Experimenten. Als Standard wurde Monomethyl-Arginin (NMMA) eingesetzt. Nach Einengen von je 2 ml Zelllysate oder Zellüberstand wurde das Pellet in 100  $\mu$ l 0,1 n HCl und 900  $\mu$ l PBS resuspendiert. Bevor die Proben auf die Oasis MCX 1 cc Säulen (Waters, Eschborn) gegeben wurden, mussten diese zuvor mit Hilfe der Waters Vakuum Station mit 1 ml MeOH / 1 ml H<sub>2</sub>O äquilibriert werden. Anschließend folgten 2 Waschstschritte mit 1 ml 0,1 n HCl und 1 ml 100% MeOH, ehe die basischen Aminosäuren mit 1 ml MeOH / H<sub>2</sub>O / NH<sub>4</sub>OH (5 : 4 : 1) eluiert werden konnten. Das Eluat wurde zur Trockne eingedunstet und in 400  $\mu$ l Boratpuffer pH 10 aufgenommen. Die Durchführung der HPLC-Messung erfolgte dann mit jeweils 150  $\mu$ l der Proben wie in Kapitel 2.4.3.3 beschrieben. Zur Identifizierung des korrekten ADMA-Peaks erfolgte die Zugabe von 2 nmol ADMA zu einer parallelen Probe.

Eine Reduktion der eNOS-Aktivität durch intrazelluläres ADMA konnte auch in der Gruppe um Rainer Böger beobachtet werden: Patienten mit Hyperhomocysteinämie zeigten eine endotheliale Dysfunktion durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO, die vermutlich durch die Akkumulation von ADMA entstand und den oxidativen Stress erhöhte. Die Verabreichung von Arginin normalisierte die endothel-abhängige Vasodilatation bei diesen Patienten (Sydow et al., 2003).

Lysinurische Proteinintoleranz (LPI), eine seltene autosomal rezessive Erkrankung ist bedingt durch Mutationen in System  $\gamma^+$ -L-Transporter  $\gamma^+$ LAT1 (SLC7A7) in der Membran von Epithelzellen im Dünndarm und Nierentubulus. Die Folge ist ein Mangel an Arginin, Ornithin und Lysin, durch die Störung der tubulären Reabsorption. Bedingt durch den Argininmangel sind die Plasma-NO-Konzentrationen in LPI-Patienten im Vergleich zu Gesunden auf 30 bis 35% reduziert, können aber durch Infusion von Arginin auf normale Werte angehoben werden. Die intrazellulären Arginin-Konzentrationen in den Endothelzellen der Patienten würden theoretisch ausreichen, um die eNOS mit Substrat zu versorgen, trotzdem kommt es zu endothelialer Dysfunktion (Kamada et al., 2001). Da auch ein Mangel an Ornithin vorliegt, ist der Harnstoffzyklus und damit die Citrullin-Bereitstellung eingeschränkt (Übersicht: Palacin et al., 2004), was in einer Reduktion der intrazellulären Arginin-Quelle aus Recycling resultieren könnte. Daher kann auch hier spekuliert werden, ob das Substrat der endothelialen NO-Synthese in LPI-Patienten vornehmlich aus Proteinabbau stammt und so der endogene NOS-Inhibitor ADMA spezifisch akkumuliert und die Hemmung verursacht. In Endothelzellen könnte  $\gamma^+$ LAT als Exporter für methyliertes Arginin fungieren, wenn dieses in die austauschbare Arginin-Quelle gelangt. Allerdings sind bisher keine Daten veröffentlicht, die den Transport von methylierten Argininen durch System  $\gamma^+$  belegen. Durch eine Herunterregulation von  $\gamma^+$ LAT und anschließende HPLC-Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von methyliertem Arginin konnte diese Hypothese experimentell untersucht werden.

### 4.3.3 Die Bedeutung von ADMA in neurodegenerativen Erkrankungen

Bei der chronisch neurodegenerativen Krankheit Morbus Alzheimer sterben kontinuierlich kortikale Neuronen ab, was auf oxidativen Stress zurückzuführen ist. Letztlich ist die funktionelle Schädigung der Neuronen wahrscheinlich auf die Reaktion freier Radikale oder ihrer Sekundärprodukte mit zellulären Proteinen zurückzuführen, wodurch die Funktion von Enzymen oder Strukturproteinen beeinträchtigt wird. In Alzheimer-Erkrankungen wurden erhöhte NO- und 3-Nitrotyrosin-Spiegel beschrieben (Hensley et al., 1998; Smith et al., 1997; Su et al., 1997; Tohgi et al., 1999). Durch die Reaktion von NO mit Superoxid-Radikalen entsteht Peroxynitrit. Dieses reagiert mit SOD und es wird das stabile 3-Nitrotyrosin gebildet. (Bowling et al., 1995; Multhaup et al., 1997). Das Absterben der Neuronen während des normalen Alterungsprozesses und bei Alzheimer-Erkrankungen ist somit auch durch NO vermittelt. ADMA könnte dabei eine zentrale Rolle während des Alterns und der Pathogenese von Alzheimer spielen. So publizierten Abe et al. (2001), dass die ADMA-Konzentrationen in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) in Patienten mit Alzheimer um 48% niedriger sind als in der Kontrollgruppe bei gleich bleibenden Argininkonzentrationen. Die erhöhte NO-Produktion in der CSF von Patienten mit Morbus Alzheimer könnte daher durch Verminderung der NOS-Inhibition durch ADMA zu erklären sein.

Vaskuläre Risikofaktoren wie Atherosklerose (Hofman et al., 1997), Hypercholesterinämie (Kivipelto et al., 2001), Bluthochdruck (Elias et al., 1993) oder Typ 2-Diabetes (Ott et al., 1999) erhöhen signifikant das Risiko für das Fortschreiten der Alzheimerschen Krankheit. Erhöhte Konzentrationen von Homocystein sind scheinbar sowohl mit verstärktem Risiko von vaskulären Erkrankungen als auch mit Alzheimer-Erkrankungen assoziiert. In Arbeiten von M. L. Selley (2003 und 2004) wurde gezeigt, dass erhöhte Homocystein-Konzentrationen im Plasma von Alzheimer-Patienten durch Inhibition der endothelialen DDAH zu einer Akkumulation von ADMA und weitergehend zu einer Inhibition der NO-Synthese führten. Es besteht der Verdacht, dass durch die Beeinträchtigung des cerebralen Blutflusses die Pathogenese von Alzheimer beeinflusst wird. Somit besteht eine inverse Korrelation zu der Konzentration von NO in der CSF von Alzheimer-Patienten, bei der sich die erhöhten NO-Konzentrationen, bedingt durch verminderte ADMA-Konzentrationen, negativ auf das Krankheitsbild auswirken (Abe et al., 2001).

Gerade bei Betrachtung der entgegengesetzten Wirkungen von NO und ADMA im cerebralen Blutfluss und in der CSF bei der Pathogenese von Alzheimer ist es von immenser Bedeutung herauszufinden, welche intrazellulären Arginin-Quellen in welchen Geweben oder Zelltypen unter pathophysiologischen Bedingungen zur NO-Synthese genutzt werden. Von einer Behandlungsmöglichkeit mit extrazellulärer Arginingabe muss daher unter Berücksichtigung der Studienresultate generell abgeraten werden.



## 4.4 Ausblick und weiterführende Experimente

Zur weiterführenderen Charakterisierung der Substratversorgung von endothelialer und neuronaler NOS stehen künftige Experimente in verschiedenen Zelltypen noch aus. Im Folgenden sind einige Problemstellungen und mögliche Lösungsansätze aufgeführt.

### 4.4.1 Substratversorgung der eNOS und nNOS

- Einspeisung von endogenem ADMA in die nicht-austauschbare Arginin-Quelle  
Durch Manipulation der intrazellulären ADMA-Spiegel kann überprüft werden, ob sich die Verfügbarkeit der nicht-austauschbaren Arginin-Quelle ändert. Eine Erhöhung der endogenen ADMA-Konzentrationen kann über die verstärkte Methylierung zellulärer Proteine durch PRMTs bei gleichzeitiger Hemmung der ADMA-abbauenden DDAHs erreicht werden. Alternativ können die Zellen mit Substanzen behandelt werden, die erwiesenermaßen eine Erhöhung der Proteinmethylierung an Argininresten bewirken, wie z.B. Methionin oder Homocystein. Eine Verminderung der ADMA-Konzentration kann entsprechend durch Überexpression oder Induktion der DDAH in Kombination mit PRMT-Inhibitoren erzielt werden.
- Kolokalisation von Arginin-bereitstellenden Enzymen und den beiden NOS-Isoformen  
Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten darauf hin, dass zwischen den Arginin-bereitstellenden Enzymen Argininosuccinat-Lyase (ASL) bzw. der noch nicht identifizierten Peptidase und der eNOS eine enge Assoziation bestehen muss. Eine Verbindung von nNOS in A673 Neuroepitheliumzellen müsste lediglich zur Peptidase, nicht aber zur ASL vorhanden sein, in TGW-nu-1 Neuroblastomzellen allerdings zu beiden Arginin-bereitstellenden Enzymen. Eine Kolokalisation von ASL und eNOS bzw. nNOS könnte einerseits durch Immunpräzipitationen andererseits durch Immunfärbungen mit anschließender konfokaler Mikroskopie gezeigt werden. Durch einen eventuellen Einsatz spezifischer Peptidase-Inhibitoren könnte die Peptidase unter Umständen identifiziert und im Erfolgsfall anschließend ebenfalls ihre Kolokalisation zu eNOS und nNOS untersucht werden.

- Entkopplung der eNOS- und nNOS-Aktivität in Abhängigkeit von der intrazellulären Arginin-Quelle

Der in unseren Versuchsansätzen herbeigeführte partielle Substratmangel könnte auch zu einer Entkopplung der NOS geführt haben. Dies würde bedeuten, dass für die Verminderung des bioaktiven NOs außer der reduzierten Produktion auch eine vermehrte Sauerstoffradikalbildung verantwortlich wäre. Dies würde auch erklären, warum höhere Konzentrationen SOD die Reduktion der NO-Produktion vermindern kann. Sauerstoffradikale können z. B. mit Hilfe des Farbreagens DCFH-DA im Fluorimeter quantifiziert und so eine eventuelle Entkopplung der NOS unter den Versuchsbedingungen dokumentieren. Da Sauerstoffradikale nicht nur von NO-Synthasen stammen können, muss ihre Bildung durch NOS-Inhibitoren hemmbar sein, um sie der NOS zuordnen zu können.

- Einfluss des System N-vermittelten Transports auf die Arginin-Bereitstellung aus dem Recyclingweg

Unsere Untersuchungen der eNOS-Aktivität weisen darauf hin, dass der System N Transporter SN1 für einen Austausch von extrazellulärem Glutamin oder Histidin gegen intrazelluläres Citrullin und damit für die Verarmung der „Recycling“-Quelle durch diese Aminosäuren verantwortlich sein könnte. Obwohl die nNOS-Aktivität in A673 Neuroepitheliumzellen nicht durch Glutamin beeinflusst wurde, konnte eine Reduktion der intrazellulären Citrullin-Konzentrationen durch extrazelluläres Glutamin in HPLC-Analysen gemessen werden. Diese Versuche müssen künftig ebenfalls in TGW-nu-1 Neuroblastomzellen durchgeführt werden, da in diesem Zelltyp kein Einfluss von Glutamin auf die NO-Synthese nachgewiesen werden konnte, obwohl die Zellen recyceltes Arginin zur NO-Synthese verwenden können.

Weiterhin wurde bisher Citrullin nicht als SN1-Substrat beschrieben. Nach Expression von SN1 in *Xenopus laevis*-Oocyten kann in Transportstudien überprüft werden, ob diese Aminosäure ein Substrat für SN1 darstellt. Sollte dies der Fall sein, kann die Expression von SN1 durch einen siRNA-Ansatz ausgeschaltet und festgestellt werden, ob so die Hemmwirkung auf die NOS-Aktivität vermindert bzw. der Glutamin-Citrullin-Austausch beeinflusst wird.

- Einfluss des PHT1-vermittelten Transports auf die Arginin-Bereitstellung aus Proteinabbau

Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Histidin einen zusätzlichen Effekt auf die NO-Produktion hat, der über den System N-vermittelten Transport alleine nicht zu erklären ist. Die Vermutung, dass Histidin über den PHT1-vermittelten Transport intrazelluläre arginin-haltige Peptide aus der Zelle depletiert, muss experimentell noch bestätigt werden. Hierzu könnte z. B. nach Expression von PHT1 in *Xenopus laevis*-Oocyten ein Austausch von extrazellulärem Histidin gegen intrazelluläre radioaktiv markierte Peptide nachgewiesen werden. Analog zu siRNA-Experimenten mit SN1 könnte dann auch der PHT1 z. B. in A673 Neuroepitheliumzellen ausgeschaltet und untersucht werden, ob so die Hemmwirkung von Histidin auf die NO-Synthese aufgehoben wird.

## 5 Zusammenfassung

Resultate dieser Arbeit zeigen, dass endotheliale und neuronale NO-Synthasen (eNOS und nNOS) ihr Substrat Arginin nicht ausschließlich aus extrazellulären, sondern auch aus intrazellulären Quellen beziehen. Das Substrat aus den intrazellulären Quellen scheint nicht über Membrantransporter in den Extrazellulärraum gelangen zu können. Dies deutet darauf hin, dass eine enge Assoziation der Arginin-bereitstellenden Enzyme mit eNOS bzw. nNOS vorliegen könnte. Dadurch würde das durch diese Enzyme generierte Arginin direkt an die NOS weitergereicht und nicht über Transporter gegen andere basische Aminosäuren (AS) im Extrazellulärraum ausgetauscht werden.

Eine intrazelluläre Substrat-Quelle besteht aus dem so genannten „Recycling“, der Umwandlung des bei der NO-Synthese entstehenden Citrullins in Arginin. Eine Kopplung von Arginin-bereitstellenden „Recycling“-Enzymen mit NOS wird in Endothelzellen und teilweise auch in TGW-nu-I Neuroblastomzellen beobachtet, nicht jedoch in A673 Neuroepitheliumzellen. Die Kopplung scheint daher vom Zelltyp abhängig zu sein. Das zur Arginin-Regeneration benötigte Citrullin kann allen untersuchten Zellen durch den Austausch mit spezifischen neutralen AS, die ausschließlich zum Substratprofil des System N Transporters SN1 passen, entzogen werden. Die Anwesenheit von SN1-Substraten im Extrazellulärraum führt daher indirekt zu einer Depletion der Recycling-Quelle. SN1 mRNA ist in allen untersuchten Zellen nachweisbar.

Aus Protein-Abbau stammendes Arginin stellt den zweiten Teil der intrazellulären Arginin-Quelle dar. Dieser ist in allen untersuchten eNOS- oder nNOS exprimierenden Zellen vorhanden. Das Arginin stammt dabei sowohl aus lysosomalem als auch proteasomalem Proteinabbau, wie der Einsatz spezifischer Inhibitoren zeigt. Extrazelluläres Histidin (aber keine andere Aminosäure) kann diese Arginin-Quelle depletieren. Wir vermuten deshalb, dass Histidin über den Peptid-Histidin-Transporter PHT1, der in allen untersuchten Zellen stark exprimiert ist, gegen die durch lysosomalen und proteasomalen Proteinabbau entstehenden Arginin-haltigen Di- und Tripeptide ausgetauscht wird. Der wichtigste endogene NOS-Inhibitor, asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), ein Marker für endotheliale Dysfunktion und Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, stammt ebenfalls aus Proteinabbau. Die Verfügbarkeit dieser intrazellulären Arginin-Quelle wird deshalb stark vom Methylierungsgrad des Arginins in den abgebauten Proteinen abhängen. Eine lokale ADMA-Anreicherung könnte eine

Erklärung für das Arginin-Paradox sein, der unter pathophysiologischen Bedingungen beobachteten Verminderung der endothelialen NO-Synthese bei anscheinend ausreichenden intrazellulären Argininkonzentrationen. Da auch in neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, ADMA eine Rolle zu spielen scheint, könnte das Arginin-Paradox auch für die nNOS-vermittelte NO-Synthese von Bedeutung sein.

Die Resultate demonstrieren, dass die Substratversorgung der beiden NOS-Isoformen nicht ausschließlich von kationischen Aminosäuretransportern abhängig ist, sondern auch von Transportern für neutrale Aminosäuren und Peptide, und außerdem von Arginin-bereitstellenden Enzymen. Der jeweilige Beitrag der verschiedenen Arginin-Quellen zur Substratversorgung der NOS ist daher abhängig vom Anteil der jeweiligen Aminosäuren und Peptide in der extrazellulären Flüssigkeit.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ADP .....	Adenosindiphosphat
Arg .....	Arginin
as .....	nicht kodogener Strang (antisense)
AS .....	Aminosäure
ATP .....	Adenosintriphosphat
BAS .....	basische Aminosäuren
BCH .....	2-Aminobizylo-[2,2,1]-heptan-2-carbonsäure
bp .....	Basenpaare
4F2hc .....	schwere Kette des 4F2 Oberflächenantigens (4F2 heavy chain)
4F2hc .....	schwere Kette des 4F2 Oberflächenantigens (4F2 heavy chain)
CAT .....	Transporter für kationische Aminosäuren (cationic amino acid transporter) (h für human, m für murin, r für Ratte)
cDNA .....	copy DNA
Cit .....	Citrullin
Cpm .....	Zählrate pro Minute (counts per minute)
DAPI .....	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DDAH .....	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DMEM .....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
dNTP .....	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA .....	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)tetraessigsäure
eNOS .....	endotheliale NO-Synthase
EtBr .....	Ethidiumbromid
EtOH .....	Ethanol
FBS .....	Rinderserumalbumin
fwd .....	forword
G418 .....	Geneticin 418 Sulfat
GFP .....	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
Gln .....	Glutamin

HAT.....	hetero(di)mere Aminosäure-Transporter
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> .....	demineralisiertes Wasser (routinemäßig autoklaviert)
H <sub>2</sub> O <sub>reinst.</sub> .....	Reinstwasser aus Millipore-Anlage (autoklaviert)
His.....	Histidin
IMDM.....	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
iNOS.....	induzierbare NO-Synthase
kb.....	Kilobasen
kDa.....	Kilo-Dalton
K <sub>M</sub> .....	Michaelis-Menten-Konstante
LAT.....	System L-Aminosäuretransporter
LPI.....	lysinurische Proteinintoleranz
LYS.....	Lysin
MCS.....	multiple cloning site
ME.....	β-Mercaptoethanol
MeAIB.....	N-Methyl-Aminoisobutyric Acid
MuLV.....	murine Leukämieviren
NAD(P)H.....	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NAS.....	neutrale Aminosäuren
NO.....	Stickstoffmonoxid
NOS.....	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS.....	neuronale NO-Synthase
nt.....	Nukleotide
NTPs.....	Nukleosidtriphosphate
OD.....	Optische Dichte
ox.....	oxidiert
p.a.....	pro analysi
PBS.....	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR.....	Polymerase-Chain-Reaktion
PHT.....	Peptid-Histidin-Transporter
PRMT.....	Protein-Arginin-N-Methyltransferasen
rBAT.....	verwandt zu Aminosäure-Transporter b <sup>0,+</sup> (related to b <sup>0,+</sup> amino acid transporter)
red.....	reduziert
rev.....	Reverse
rpm.....	revolutions per minute
RT (20-25 °C).....	Raumtemperatur

---

SD.....	Standardabweichung (standard deviation)
SEM.....	Standardfehler (standard error of mean)
SN.....	System N-Transporter
ss .....	kodogener Strang (sense strand)
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
TBE.....	Tris-Borat-EDTA
TBS.....	Tris Buffered Saline
TE .....	Tris-EDTA
TM.....	Transmembrandomäne(n)
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U .....	Unit
ü. N. ....	über Nacht
V .....	Volt
V <sub>max</sub> .....	maximale Transportgeschwindigkeit



## 7 Literaturverzeichnis

Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Konno, H., Kato, T. und Itoyama, Y. (1997) Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 19, 124-128

Abe, T., Tohgi, H., Murata, T., Isobe, C. und Sato, C. (2001) Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 312, 177-179

Albritton, L. M., Tseng, L., Scadden, D. und Cunningham, J. M. (1989) A putative murine ectopic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 57, 659-666

Albritton, L. M., Bowcock, A. M., Eddy, R. L., Morton, C. C., Tseng, L., Farrer, L. A., Cavalli, S. L., Shows, T. B. und Cunningham, J. M. (1992) The human cationic amino acid transporter (ATRC1): Physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics* 12, 430-434

Alderton, W. K., Cooper, C. E. und Knowles, R. G. (2001) Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *Biochem J* 357, 593-615

Andrew, P. J. und Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3), 521-31

Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. und Murad, F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Nat Acad Sci USA* 74, 3203-3207

Arnt-Ramos, L. R., O'Brien, W. E. und Vincent, S. R. (1992) Immunohistochemical localization of argininosuccinate synthetase in the rat brain in relation to nitric oxide synthase-containing neurons. *Neuroscience* 51, 773-789

Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y. N., Murdoch, G. H., North, R. A. und Amara, S. G. (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* 268, 15329-15332

Balligand, J. L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D. M., Belhassen, L., O'Hara, D. S., Kelly, R. A., Smith, T. W. und Michel, T. (1995) Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270, 14582-14586

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

Barbul, A. (1986) Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parent Ent Nutr* 10, 227-238

Barnes, E. N., Biedler, J. L., Spengler, B.A. und Lyser, K.M. (1981) The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC. *In Vitro* 17, 619-631

Bertran, J., Werner, A., Moore, M. L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacin, M. und Murer, H. (1992) Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proc Nat Acad Sci USA* 89, 5601-5605

Biedler, J. L., Helson, L. und Spengler, B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33, 2643-2652

Bode, B. P. (2001) Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr* 131 (9 Suppl) 2475S-2485S

Bode, B. P., Kaminski, D. L., Souba, W. W. und Li, A. P. (1995) Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology* 21, 511-520

Böger, R. H., Sydow, K., Borlak, J., Thum, T., Lenzen, H., Schubert, B., Tsikas, D. und Bode-Böger, S. M. (2000) LDL Cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells.- Involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyl transferases. *Circ Res* 87, 99-105

Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Sydow, K., Heistad, D. D. und Lentz, S. R. (2000) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1557-1564

Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Szuba, A., Tangphao, O. und Tsao, P. S. (1998) ADMA: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98, 1842-1847

Botka, C. W., Witting, T. W., Graul, R. C., Nielsen, C. U., Sadée, W., Higaki, K. und Amidon, G. L. (2000) Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: Identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS Pharm Sci* 2: Article 16

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. und Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771

Bowling, A. C. und Beal, M. F. (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sciences* 56 1151–1171

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72, 248-258

Braissant, O., Gotoh, T., Loup, M., Mori, M. und Bachmann, C. (1999) L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 70, 231-241

Bredt, D. S. und Snyder, S. H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 682-685

Broer, A., Deitmer, J. W. und Broer, S. (2004) Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia* 48, 298-310

Broer, A., Wagner, C. A., Lang, F. und Broer, S. (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y<sup>+</sup>LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* 349, 787-795

Broer, A., Wagner, C., Lang, F. und Broer, S. (2000) Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na<sup>+</sup> exchange and a substrate-gated anion conductance. *Biochem J* 346, 705–710

Broer, S., Cavanaugh, J. A. und Rasko, J. E. (2005) Neutral amino acid transport in epithelial cells and its malfunction in Hartnup disorder. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 1), 233-236

Broer, A., Albers, A., Setiawan, I., Edwards, R. H., Chaudhry, F. A., Lang, F., Wagner, C. A. und Broer, S. (2002) Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J Physiol* 539(Pt 1), 3-14

Cardounel, A. J., Xia, Y. und Zweier, J. L. (2005) Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 280, 7540-7549

Cariappa, R., Heath-Monning, E., Furesz, T. C., Kamath, S. G. und Smith, C. H. (2002) Stable polarized expression of hCAT-1 in an epithelial cell line. *J Membr Biol* 186, 23-30

Chabrier, P.-E., Demerlé-Pallardy, C. und Auguet M. (1999) Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* 55, 1029-1035

Charles, I. G., Palmer, R. M. J., Hickery, M. S., Bayliss, M. T., Chubb, A. P., Hall, V. S., Moss, D. W. und Moncada, S. (1993) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11419-11423

Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R. und Edwards, R. H. (1999) Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99, 769-780

Chen, F. Y. und Lee, T. J. (1995) Arginine synthesis from citrulline in perivascular nerves of cerebral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 273, 895-901

Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadski, J. V. und Jothianandan, D. (1982) The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Nat Acad Sci* 79, 2106-2110

Chillaron, J., Estevez, R., Mora, C., Wagner, C. A., Suessbrich, H., Lang, F., Gelpi, J. L., Testar, X., Busch, A. E., Zorzano, A. und Palacin, M. (1996) Obligatory amino acid exchange via systems bo,+/-like and y+L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem* 271,17761–17770

Choi, H. J., Kim, S. W., Im, J. H., Lee, S. G., Kim, M. und Hwang, O. (2003) Utilization of exogenous tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthesis in human neuroblastoma cell line. *Neurosci Lett* 352(2), 89-92

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159

Christensen, H. N. (1964) A Transport System Serving for Mono- and Diamino Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 337-344

Christensen, H. N. (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*, 70, 43-77

Christensen, H. N. and Antonioli, J. A. (1969) Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na<sup>+</sup>-dependent inhibition of Na<sup>+</sup>-independent transport. *J Biol Chem*, 244, 1497-1504

Christensen, H. N., Liang, M. und Archer, E. G. (1967) A distinct Na<sup>+</sup>-requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids. *J Biol Chem* 242, 5237-5246

Christensen, H. N., Oxender, D. L., Liang, M. und Vatz, K. A. (1965) The use of N-methylation to direct the route of mediated transport of amino acids. *J Biol Chem* 240, 3609-3616

Closs, E. I., Gräf, P., Habermeier, A., Cunningham, J. M. und Förstermann, U. (1997) The human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A and hCAT-2B: Three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36, 6462-6468

Closs, E. I., Scheld, J.-S., Sharafi, M. und Förstermann, U. (2000) Substrate supply for NO synthase in macrophages and endothelial cells: the role of cationic amino acid transporters (CATs). *Mol Pharmacol* 57, 68-74

- Collins, C. L., Wasa, M., Souba, W. W. und Abcouwer, S. F. (1998) Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol* 176, 166-178
- Cooke, J. P. (2000) Does AMDA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2032-3037
- Daniel, H. und Kottra, G. (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Eur J Physiol* 447, 610-618
- Daniel, E. E., Wang, Y. F., Salapatek, A. M., Mao, Y. K. und Mori, M. (2002) Argininosuccinate synthetase, argininosuccinate lyase and NOS in canine gastrointestinal tract: immunocytochemical studies. *Neurogastroenterol Motil* 12, 317-334
- Devés, R. and Boyd, C. A. (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*, 78, 487-545
- Devés, R., Chavez, P. and Boyd, C. A. (1992) Identification of a new transport system ( $\gamma$ +L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol*, 454, 491-501
- Dexter, D. L., Spremulli, E. N., Fligiel, Z., Barbosa, J. A., Vogel, R., VanVoorhees, A. und Calabresi, P. (1981) Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med* 71, 949-956
- Dhanakoti, N., Brosnan, M. E., Herzberg, G. R. und Brosnan, J. T. (1992) Cellular and subcellular localization of enzymes of arginine metabolism in rat kidney. *Biochem J* 282, 369–375
- Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A. und Snyder, S. H. (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4214-4218
- Dun, N. L., Dun, S. L., Förstermann, U. und Tseng, L. F. (1992) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 147, 217-220
- Dun, N. J., Dun, S. L., Wu, S. Y. und Förstermann, U. (1993) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci Lett* 158, 51-54

Edgell, C. J., McDonald, C. C. und Graham, J. B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 3734-3737

Elias, M. E., Wolf, P. A., D'Agostino, R. B., Cobb, J. Und White, L. R. (1993) Untreated blood pressure level is inversely related to cognitive functioning: the Framington study. *Am J Epidemiol* 138, 353-364

Fei, Y. J., Prasad, P. D., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1995) The amino acid transport system  $\gamma(+)$ L induced in *Xenopus laevis* oocytes by human choriocarcinoma cell (JAR) mRNA is functionally related to the heavy chain of the 4F2 cell surface antigen. *Biochemistry* 34, 8744-8751

Fei, Y. J., Sugawara, M., Nakanishi, T., Huang, W., Wang, H., Prasad, P. D., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (2000) Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N1, a  $\text{Na}^+$ - and  $\text{H}^+$ -coupled glutamine transporter. *J Biol Chem* 275, 23707-23717

Fernandez, E., Carrascal, M., Rousaud, F., Abian, J., Zorzano, A., Palacin, M. und Chillaron, J. (2002) rBAT-b<sub>0,+</sub>AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol* 283, F540–F548

Flam, B. R., Hartmann, P. J., Harrell-Booth, M., Solomonson, L. P. und Eichler, D. C. (2001) Caveolar localization of arginine regeneration enzymes, argininosuccinatesynthase, and lyase, with endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 5, 187–197

Forgeur, A., Svoboda, M., Winand, J., Robberecht, P. und Delporte, C. (1999) Human A-type ANP receptor upregulation by PACAP and carbachol in neuroblastoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 150, 189-193

Förstermann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H. H. W., Heller, M. und Murad, F. (1991) 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* 88, 1788-1792

Förstermann, U., Pollock, J. S. und Nakane, M. (1993) Nitric oxide in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* 3, 104-110

Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. und Kleinert, H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes: characterization, molecular cloning and functions. *Hypertension* 23, 1121-1131

Förstermann, U. und Kleinert, H. (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352, 351-364

Förstermann, U., Boissel, J.-P. und Kleinert, H. (1998) Expressional control of the "constitutive" isoforms nitric oxide synthase. *FASEB J.* 12, 773-790

Furchgott, R. F. und Zawadski, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by Ach. *Nature* 288, 373-376

Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadski, J. V. und Jothianandan, D. (1984) Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6, Suppl.2, 336-344

Furchgott, R.F. (1988) Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports* 19, 235-251

Furesz, T. C., Moe, A. J. und Smith, C. H. (1991) Two cationic amino acid transport systems in human placental basal plasma membranes. *Am J Physiol* 261, C246-252

Galdal, K. S., Evensen, S. A., Hoglund, A. S. und Nilsen, E. (1984) Actin pools and actin microfilament organization in cultured human endothelial cells after exposure to thrombin. *Br J Haematol* 58, 617-625

Galietta, L. J., Musante, L., Romio, L., Caruso, U., Fantasia, A., Gazzolo, A., Romano, L., Sacco, O., Rossi, G. A., Varesio, L. und Zegarra-Moran, O. (1998) An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 275, L917-L923

Gally, J. A., Montague, P. R., Reeke, G. N. und Edelman, G. M. (1990) The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3547-3551



Gath, I., Closs, E. I., Gödtel-Armbrust, U., Schmitt, S., Nakane, M., Wessler, I. und Förstermann, U. (1996) Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB J* 10, 1614-1620

Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nüssler, A. K., Di, S. M., Wang, S. C., Nakayama, D. K., Simmons, R. L., Snyder, S. H. und Billiar, T. R. (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3491-3495

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. und Parks, W. P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423

Gotoh, T., Araki, M. und Mori, M. (1997) Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 487-491

Gräf, P., Förstermann, U. und Closs, E. I. (2001) The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 132, 1193-1200

Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Gruetter, D. Y., Kadowitz, P. J. und Ignarro, L. J. (1979) Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitropusside and carcinogenic nitrosamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 5, 211-214

Gu, S., Roderick, H. L., Camacho, P. und Jiang, J. X. (2000) Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3230-3235

Habermeier, A., Wolf, S., Martine, U., Gräf, P. und Closs, E. I. (2003) Two amino acid residues determine the low substrate affinity of the human cationic amino acid transporter-2A (hCAT-2A). *J Biol Chem* 278, 19492-19499

Hah, J. M., Roman, L. J., Martasek, P. und Silverman, R. B. (2001) Reduced amide bond peptidomimetics. (4S)-N-(4-amino-5-[aminoalkyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidines, potent and highly selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *J Med Chem* 44(16), 2667-2670

Hassall, C. J., Saffrey, M. J., Belai, A., Hoyle, C. H., Moules, E. W., Moss, J., Schmidt, H. H., Murad, F., Förstermann, U. und Burnstock, G. (1992) Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart. *Neurosci Lett* 143, 65-68

Hatanaka, T., Huang, W., Wang, H., Sugawara, M., Prasad, P. D., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (2000) Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 1467, 1-6

Harbrecht, B. G., Wu, B., Watkins, S. C., Billiar, T. R. und Peitzman, A. B. (1997) Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock* 8, 415-421

Hay, R. J., Williams, C. D., Macy, M. L. und Lavappa, K.S. (1982) Cultured cell lines for research on pulmonary physiology available through the American type culture collection. *Am Rev Respir Dis* 125, 222-232

Hecker, M., Mülsch, A. und Busse R. (1994) Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 62, 1524-1529

Hecker, M., Mitchell, J. A., Swierkosz, T. A., Sessa, W. C. und Vane, J. R. (1990) Inhibition by L-glutamine of the release of endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol* 101, 237-239

Helfrich, M. H., Evans, D. E., Grabowski, P. S., Pollock, J. S., Ohshima, H. und Ralston, S. H. (1997) Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res* 12, 1108-1115

Hensley, K., Maidt, M. L., Yu, Z., Sang, H., Markesbery, W. R. und Floyd, R. A. (1998) Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci* 18, 8126-8132

Herrera-Ruiz, D., Wang, Q., Gudmundsson, O. S., Cook, T. J., Smith, R. L., Faria, T. N. und Knipp, G. T. (2001) Spatial expression patterns of peptide transporters in the human and rat gastrointestinal tracts, Caco-2 in vitro cell culture, and multiple human tissues. *AAPS Pharm Sci* 3: Article 9

Herrera-Ruiz, D. und Knipp, G. T. (2002) Current perspectives on established and putative mammalian oligopeptide transporters. *J Pharm Sci* 92, 691-714

Hevel, J. M., White, K. A. und Marletta, M. A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266, 22789-22791

Hofman, H., Ott, A., Breteler, M. M., Bots, M. L., Slooter, A. J. und van Harskamp, F. (1997) Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam study. *Lancet* 349, 151-154

Huang, H., Martasek, P., Roman, L. J., Masters, B. S. und Silverman, R. B. (199) N(omega)-Nitroarginine-containing dipeptide amides. Potent and highly selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *J Med Chem* 42(16), 3147-53

Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S. und Kadowitz, P. J. (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 237, 893-900

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. und Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 84, 9265-9269

Ignarro, L. J., Byrns, R. E. and Wood, K. S. (1988) Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In: *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, and endothelium*, (edited by P. M. Vanhoutte), Raven Press, New York, 427-435

Ito, A., Tsao, P. S., Adimoolam, S., Kimono, M., Ogawa, T. und Cooke, J. P. (1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction – Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ* 99, 3092-3095

Janssens, S. P., Simouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B. und Bloch, K. D. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267, 14519-14522

Lielstein, J. T., Frohlich, J. C., Haller, H. und Fliser, D. (2001) ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrol Dial Transplant* 16, 1742-1745

Kamada, Y., Nagaretani, H., Tamura, S., Ohama, T., Maruyama, T., Hiraoka, H., Yamashita, S., Yamada, A., Kiso, S., Inui, Y., Ito, N., Kayanoki, Y., Kawata, S. und Matsuzawa, Y. (2001) Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. *J Clin Invest* 108, 717-724

Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. und Endou, H (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273, 23629–23632

Kanai, Y., Fukasawa, Y., Cha, S. H., Segawa, H., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Kim, J. Y., Miyamoto, K., Takeda, E. und Endou, H. (2000) Transport properties of a system  $y^+L$  neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275, 20787-20793

Kato, H., Okamura, K., Kurosawa, Y., Kishikawa, T. und Hashimoto, K. (1989) Characterization of DNA rearrangements of N-myc gene amplification in three neuroblastoma cell lines by pulsed-field gel electrophoresis. *FEBS Lett* 250, 529-535

Kekuda, R., Prasad, P. D., Fei, Y. J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1996) Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter B<sup>0</sup> from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem* 271, 18657-18661

Kielstein, J. T., Böger, R. H., Bode-Böger, S. M., Schäffer, J. und Barbey, M. (1999) Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10, 594-600

Kilberg, M. S., Handlogten, M. E. und Christensen, H. N. (1980) Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem* 255, 4011-4019

Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M. und Cunningham, J. M. (1991) Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728

- Kimoto, M., Tsuji, H., Ogawa, T. und Sasaoka, K. (1993) Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitricoxide generating systems of rat using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 300, 657–662
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M. P., Hänninen, M., Hallikainen, M. und Alhainen, K. (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447-1451
- Kizhatil, K. und Albritton, L. M. (2002) System  $\gamma$ + localizes to different membrane subdomains in the basolateral plasma membrane of epithelial cells. *Am J Physiol* 283, C1784–C1794
- Kleinert, H., Wallerath, T., Fritz, G., Ihrig-Biedert, I., Rodriguez-Pascual, F., Geller, D. A. und Forstermann, U. (1998) Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol* 125(1), 193-201
- Kleta, R., Romeo, E., Ristic, Z., Ohura, T., Stuart, C., Arcos-Burgos, M., Dave, M. H., Wagner, C. A., Camargo, S. R., Inoue, S., Matsuura, N., Helip-Wooley, A., Bockenbauer, D., Warth, R., Bernardini, I., Visser, G., Eggermann, T., Lee, P., Chairoungdua, A., Jutabha, P., Babu, E., Nilwarangkoon, S., Anzai, N., Kanai, Y., Verrey, F., Gahl, W. A. und Koizumi, A. (2004) Mutations in SLC6A19, encoding B0AT1, cause Hartnup disorder. *Nat Genet* 36(9):999-1002
- Knecht, E., Hernandez, J., Wallace, R. und Grisolia, S. (1979) Immunoferritin location of carbamoyl phosphate synthase in rat liver. *J Histochem Cytochem* 27, 975-981
- Kobzik, L., Bredt, D. S., Lowenstein, C. J., Drazen, J., Gaston, B., Sugarbaker, D. und Stamler, J. S. (1993) Nitric Oxide Synthase in Human and Rat Lung - Immunocytochemical and Histochemical Localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 371-377
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* 12, 7057-7070
- Kröncke, K. D., Fehsel, K. und Kolb-Bachofen, V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113, 147-156

- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P. und Michel, T. (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6348-6352
- Lee, D. H. und Goldberg, A. L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397-403
- Leiper, J. M., Santa Maria, J., Chubb, A., MacAllister, R. J., Charles, I. G., Whitley, G. S. T. J. und Vallance, P. (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 343, 209–214
- Leiper, J. M. und Vallance, P. (1999) Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 542-548
- Li, G., Regunathan, S., Barrow, C. J., Eshragi, J., Cooper, R. und Reis, D. J. (1994) Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263, 966–969
- Li, G., Regunathan, S. und Reis, D. J. (1995) Agmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 763, 325-329
- Lindberg, R. A., Dewhirst, M. W., Buckley, B. J., Hughes, C. S. und Whorton, A. R. (1996) Ca(2+)-dependent nitric oxide release in endothelial but not R3230Ac rat mammary adenocarcinoma cells. *Am J Physiol* 271, C332-337
- Lortie, M. J., Novotny, W. F., Peterson, O. W., Vallon, V., Malvey, K., Mendonca, M., Satriano, J., Insel, P., Thomson, S. C. und Blantz, R. C. (1996) Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J Clin Invest* 97, 413-420
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford
- Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S. und Snyder, S. H. (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6711-6715

- Lyons, C. R., Orloff, G. J. und Cunningham, J. M. (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267, 6370-6374
- MacMicking, J., Xie, Q. W. und Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15, 323-350
- Malandro, M. S. und Kilberg, M. S. (1996) Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* 65, 305-336
- Mann, G. E., Yudilevich, D. L. und Sobrevia, L. (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 83, 183-252
- Marletta, M. A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78(6), 927-30
- Marsden, P. A., Schappert, K. T., Chen, H. S., Flowers, M., Sundell, C. L., Wilcox, J. N., Lamas, S. und Michel, T. (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 307, 287-293
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., Loffing, J., Shoemaker, C. B. und Verrey, F. (1998) Amino acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395, 288-291
- Mayer, B., John, M. und Böhme, E. (1990) Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277, 215-219
- McCune, B. K., Patterson, K., Chandra, R. S., Kapur, S., Sporn, M. B. und Tsokos, M. (1993) Expression of transforming growth factor-beta isoforms in small round cell tumors of childhood. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 142, 49-58
- Miyataka, K., Gotoh, T., Nagasaki, A., Takeya, M., Ozaki, M., Iwase, K., Takiguchi, M., Iyama, K.I., Tomita, K. und Mori, M. (1998) Immunohistochemical localization of arginase II and other enzymes of arginine metabolism in rat kidney and liver. *Histochem J* 30, 741-751
- Moncada, S. und Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27), 2002-12

Morris, S. M. (1992) Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 12, 81-101

Morrissey, J., McCracken, R., Ishidoya, S. und Klahr, S. (1995) Partial cloning and characterization of an arginine decarboxylase in the kidney. *Kidney Int* 47, 1458-1461

Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1997) Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 54, 533-539

Murad, F., Mittal, C. K., Arnold, W. P., Katsuki, S. und Kimura, H. (1978) Guanylate cyclase activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9, 145-158

Murad, F., Arnold, W. P., Mittal, C. K. und Braughler, J. M. (1979) Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions of cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 11, 175-204

Nakamura, H., Saheki, T., Ichiki, H., Nakata, K. und Nakagawa, S. (1991) Immunocytochemical localization of argininosuccinate synthetase in the rat brain. *J Comp Neurol* 312, 652-679

Nakamura, H., Saheki, T. und Nakagawa, S. (1990) Differential cellular localization of enzymes of L-arginine metabolism in the rat brain. *Brain Res* 530, 108-112

Nakane, M., Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., Förstermann, U. und Murad, F. (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316, 175-180

Nakanishi, T., Kekuda, R., Fei, Y. J., Hatanaka, T., Sugawara, M., Martingale, R. G., Leibach, F. H., Prasad, P. D. und Ganapathy, V. (2001a) Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol* 281, C1757-C1768

Nakanishi, T., Sugawara, M., Huang, W., Martingale, R. G., Leibach, F. H., Ganapathy, M. E., Prasad, P. D. und Ganapathy, V. (2001b) Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 1343-1348



Newton, C. R. und Graham, A. (1994) PCR. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford

Nicholl, D. S. T. (1995) Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford

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

Ogura, T., Nakayama, K., Fujisawa, H. und Esumi, H. (1996) Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. *Neurosci Lett* 204(1-2), 89-92

Okada, D. (1995) Protein kinase C modulates calcium sensitivity of nitric oxide synthase in cerebellar slices. *J Neurochem* 64(3), 1298-304

Ott, A., Stolk, R. P., van Harskamp, F. Pols, H. A. und Breteler, M. M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Neurology* 53, 1937-1942

Okada, T., Watanabe, Y., Brusilow, S. W., Traystman, R. J. und Koehler, R. C. (2000) Interaction of glutamine and arginine on cerebrovascular reactivity to hypercapnia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1577–H1584

Oxender, D. und Christensen, H. (1963) Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 238, 3686-3699

Oyadomari, S., Gotoh, T., Aoyagi, K., Araki, E., Shichiri, M. und Mori, M. (2001) Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats. *Nitric Oxide* 5, 252-260

Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J. und Zorzano, A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Phys Rev* 78, 969-1054

Palacin, M., Bertran, J., Chillaron, J., Estevez, R. und Zorzano, A. (2004) Lysinuric protein intolerance: mechanisms of pathophysiology. *Mol Gen Metab* 81, S27-37

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. und Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond.)* 327, 524-526

- Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. und Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666
- Palmer, R. M. und Moncada, S. (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158(1), 348-52
- Parmentier, S., Bohme, G. A., Lerouet, D., Damour, D., Stutzmann, J. M., Margail, I. und Plotkine, M. (1999) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol* 127(2), 546-52
- Pawlik, T. M., Souba, W. W. und Bode, B. P. (2001) Asparagine uptake in rat hepatocytes: resolution of a paradox and insights into substrate-dependent transporter regulation. *Amino Acids* 20, 335-352
- Pfeiffer, R., Rossier, G. Spindler, B., Meier, C., Kuhn, L. und Verrey, F. (1999) Amino acid transport of  $\gamma$ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J* 18, 49-57
- Pleasure, S. J. und Lee, V. M. (1993) NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res* 35, 585-602
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M. und Murad, F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10480-10484
- Pollock, J. S., Nakane, M., Buttery, L. K., Martinez, A., Springall, D., Polak, J. M., Förstermann, U. und Murad, F. (1993) Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 265, C1379-C1387
- Rabier, D. und Kamoun, P. (1995) Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids* 9, 299-316
- Raijman, L. (1974) Citrulline synthesis in rat tissues and liver content of carbamoyl phosphate and ornithine. *Biochem J* 138, 225-232

- Rasko, J. E., Battini, J. L., Gottschalk, R. J., Mazo, I. und Miller, A. D. (1999) The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2129–2134
- Ratner, S. (1973) Enzymes of arginine and urea synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 39, 1–90
- Ratner, S., Morell, H. und Carvalho, A. P. (1960) Enzymes of arginine metabolism in brain. *Arch Biochem Biophys* 91, 280-289
- Reiling, N., Kroncke, R., Ulmer, A. J., Gerdes, J., Flad, H. D. und Hauschildt, S. (1996) Nitric oxide synthase: expression of the endothelial,  $Ca^{2+}$  /calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26, 511-516
- Rodrigo, J., Riveros Moreno, V., Ventura, M. L., Uttenthal, L. O., Higgs, E. A., Fernandez, A. P., Polak, J. M., Moncada, S. und Martinez Murillo R. (1997) Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol* 378, 522-534
- Rose, W. C. (1937) The nutritive significance of the amino acids and certain related compounds. *Science* 86, 298-300
- Rossier, G., Meier, C., Bauch, C., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F. und Kuhn, L. C. (1999) LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274, 34948–34954
- Ruan, J., Xie, Q., Hutchinson, N., Cho, H., Wolfe, G. C. und Nathan, C. (1996) Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free  $Ca^{2+}$ . *J Biol Chem* 271(37), 22679-86
- Saffrey, M. J., Hassall, C. J., Hoyle, C. H., Belai, A., Moss, J., Schmidt, H. H. H. W., Förstermann, U., Murad, F. und Burnstock, G. (1992) Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones. *Neuroreport* 3, 333-336

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732), 1350-1354

Sakata, K., Yamashita, T., Maeda, M., Moriyama, Y., Shimada, S. und Tohyama M. (2001) Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem J* 356, 53-60

Sala, R., Rotoli, B. M., Colla, E., Visigalli, R., Parolai, A., Bussolanti, O., Gazzola, G. C. und Dall'Asta, V. (2002) Two-way arginine transport in human endothelial cells: TNF-alpha stimulation is restricted to system y(+). *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C134-143

Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001) In *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Sase, K. und Michel, T. (1995) Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 57, 2049-2055

Sastre, M., Galea, E., Feinstein, D., Reis, D. J. und Regunathan, S. (1998) Metabolism of agmatine in macrophages: modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. *Biochem J* 330, 1405-1409

Schmidlin, A., Fischer, S. und Wiesinger, H. (2000) Transport of L-citrulline in neural cell cultures. *Dev Neurosci* 22, 393-398

Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J., Nakane, M., Gorsky, L., Förstermann, U. und Murad, F. (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 365-369

Schmidt, H. H. H. W., Gagne, G. D., Nakane, M., Pollock, J. S., Miller, M. F. und Murad, F. (1992) Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 40, 1439-1456

Schmidt, H. H. H. W., Warner, T. D., Ishii, K., Sheng, H. und Murad, F. (1992) Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 255, 721-723

Schmidt, H. H. H. W., Warner, T. D., Nakane, M., Förstermann, U., und Murad, F. (1992) Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7 macrophages [published erratum appears in *Mol Pharmacol* (1992) 42(1), 174] *Mol Pharmacol* 41, 615-624

Selley, M. L. (2003) Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 903-907

Selley, M. L. (2004) Homocysteine increases the production of asymmetric dimethylarginine in cultured neurons. *J Neurosci Res* 77, 90-93

Seow, H. F., Broer, S., Broer, A., Bailey, C. G., Potter, S. J., Cavanaugh, J. A. und Rasko, J. E. (2004) Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat Genet* 36(9), 1003-1007

Sessa, W. C., Hecker, M., Mitchell, J. A. und Vane, J. R. (1990) The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8607-8611

Shafqat, S., Tamarappoo, B. K., Kilberg, M. S., Puranam, R. S., McNamara, J. O., Guadano-Ferraz, A. und Fremeau, R. T. Jr (1993) Cloning and expression of a novel Na<sup>(+)</sup>-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na<sup>(+)</sup>/glutamate cotransporters. *J Biol Chem* 268, 15351-15355

Shaul, P. W., North, A. J., Wu, L. C., Wells, L. B., Brannon, T. S., Lau, K. S., Michel, T., Margraf, L. R. und Star, R. A. (1994) Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 94, 2231-2236

Sheng, H., Schmidt, H. H., Nakane, M., Mitchell, J. A., Pollock, J. S., Förstermann, U. und Murad, F. (1992) Characterization and localization of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol* 106, 768-773

Sheng, H., Gagne, G. D., Matsumoto, T., Miller, M. F., Förstermann, U. und Murad, F. (1993) Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. *J Neurochem* 61, 1120-1126

- Sherman, P. A., Laubach, V. E., Reep, B. R. und Wood, E. R. (1993) Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 32, 11600-11605
- Shimizu, Y., Sakai, M., Umemura, Y. und Ueda, H. (1997) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 24, 80-87
- Shuttleworth, C. W., Burns, A. J., Ward, S. M., O'Brien, W. E. und Sanders, K. M. (1995) Recycling of L-citrulline to sustain nitric oxide-dependent enteric neurotransmission. *Neuroscience* 68, 1295-1304
- Silvagno, F., Xia, H. und Bredt, D.S. (1996) Neuronal nitric-oxide synthase- $\mu$ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 271, 11204-11208
- Sloan, J. L. und Mager, S. (1999) Cloning and functional expression of a human  $\text{Na}^+$ - and  $\text{Cl}^-$ -dependent neutral and cationic amino acid transporter  $\text{B}^{0,+}$ . *J Biol Chem* 274, 23740-23745
- Smith, M. A., Harris, R. P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S. und Perry, G. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17, 2653-2657
- Solomonson, L. P., Flam, B. R., Pendleton, L. C., Goodwin, B. L. und Eichler, D. C. (2003) The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol* 206, 2083-2087
- Souba, W. W., Pan, M. und Stevens, B. R. (1992) Kinetics of the sodium-dependent glutamine transporter in human intestinal cell confluent monolayers. *Biochem Biophys Res Commun* 188, 746-753
- Sowa, G., Liu, J., Papapetropoulos, A., Rex-Haffner, M., Hughes, T. E. und Sessa, W. C. (1999) Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem* 274, 22524-22531

- Sperandeo, M. P., Borsani, G., Incerti, B., Zollo, M., Rossi, E., Zuffardi, O., Castaldo, P., Tagliatalata, M., Andria, G. und Sebastio, G. (1998) The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics* 49, 230–236
- Steiner, H. Y., Naider, F. und Becker, J. M. (1995) The PTR family: A new group of peptide transporters. *Mol Microbiol* 16, 825-834
- Stuehr, D. J. und Marletta, M. A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7738-7742
- Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. und Nathan, C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7773-7777
- Su, J. H., Deng, G. und Cotman, C. W. (1997) Neuronal DANN damage precedes tangle formation and is associated with up-regulation of nitrotyrosine in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 774, 193–199
- Su, Y. und Block, E. R. (1995) Hypoxia inhibits L-arginine synthesis from L-citrulline in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 269, L581–L587
- Swierkosz, T. A., Mitchell, J. A., Sessa, W. C., Hecker, M. und Vane, J. R. (1990) L-glutamine inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor from the rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 143–148
- Sydow, K. und Münzel, T. (2003) ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 4, 41-51
- Sydow, K., Schwedhelm, E., Arakawa, N., Bode-Böger, S. M., Tsikas, D., Hornig, B., Frölich, J. C. und Böger, R. H. (2003) ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovascular Research* 57, 144-252
- Takada, S., Saheki, T., Igarashi, Y. und Katsuma, T. (1979) Studies on rat liver argininosuccinate synthase. *J Biochem* 85, 1309-1314

- Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. und Goto, T. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 265-274
- Tamarappoo, B. K., Raizada, M. K. Und Kilberg, M. S. (1997) Identification of a system N-like Na<sup>+</sup>-dependent glutamine transport activity in rat brain neurons. *J Neurochem* 68, 954-960
- Teerlink, T., Nijveldt, R. J., de Jong, S. und van Leeuwen, P. A. ;. (2002) Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Biochem* 303, 131-137
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E. und Isobe, C. (1999) Alteration of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 269, 52–54
- Tojo, A., Welch, W. J., Bremer, V., Kimoto, M., Kimura, K., Omata, M., Ogawa, T., Vallance, P. und Wilcox, C. S. (1997) Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 52, 1593–1601
- Tracey, W. R., Pollock, J. S., Murad, F., Nakane, M. und Förstermann, U. (1994) Identification of a type III (endothelial-like) particulate nitric oxide synthase in LLC-PK1 kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol* 266, C22-C26
- Tsuchida, Y., Sekiguchi, M., Kaneko, Y. und Kanda, N. (1990) Origin of human neuroblastoma cell lines TGW and TNB1. *FEBS Lett* 263, 191
- Utsunomiya-Tate, N., Endou, H. und Kanai, Y. (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271, 14883–14890
- Van Geldre, L. A., Timmermans, J. P. und Lefebvre, R. A. (2002) L-citrulline recycling by argininosuccinate synthetase and lyase in rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 455, 149-160



Van Winkle, L. J., Campione, A. L. und Gorman, J. M. (1988) 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* 263, 3150-3163

Van Winkle, L. J., Christensen, H. N. and Campione, A.L. (1985) Na<sup>+</sup>-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem*, 260, 12118-12123

Van Winkle, L. J. and Campione, A. L. (1987) Development of amino acid transport system B<sup>0,+</sup> in mouse blastocysts. *Biochim Biophys Acta*, 925, 164-174

Van Winkle, L. J. and Campione, A. L. (1990) Functional changes in cation-preferring amino acid transport during development of preimplantation mouse conceptuses. *Biochim Biophys Acta*, 1028, 165-173

Van Winkle, L. J., Campione, A. L. und Farrington, B. H. (1990) Development of system B<sup>0,+</sup> and a broad-scope Na<sup>+</sup>-dependent transporter of zwitterionic amino acids in preimplantation mouse conceptuses. *Biochim Biophys Acta*, 1025, 225-233

Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P. und Pritchard, K. A., Jr. (1998) Superoxide Generation by Endothelial Nitric Oxide Synthase: the Influence of Cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9220-9225

Vékony, N., Wolf, S., Boissel, J. P., Gnauert, K. und Closs, E. I. (2001) Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 40, 12387–12394

Wallerath, T., Gath, I., Aulitzky, W. E., Pollock, J. S., Kleinert, H. und Förstermann, U. (1997) Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost* 77, 163-167

Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. und Kabat, D. (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352, 729-731

- Wang, R., Ghahary, A., Shen, Y. J., Scott, P. G. und Tredget, E. E. (1996) Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol* 106, 419-427
- Wang, Y., Goligorsky, M. S., Lin, M., Wilcox, J. N. und Marsden, P. A. (1997) A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH<sub>2</sub>-terminal truncated nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 272, 11392-11401
- White, M. F. (1985) The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 822, 355-374
- Wiesinger, H. (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *P Neurobio* 64, 365-391
- Windmueller, H. G. (1982) Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* 53, 201-237
- Windmueller, H. G. und Spaeth, A. E. (1981) Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol* 241, E473–E480
- Wolf, S., Janzen, A., Vékony, N., Martiné, U., Strand, D. und Closs, E. I. (2002) Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate an amino acid transport activity. *Biochem J* 364, 767–775
- Wood, E. R., Berger, H. J., Sherman, P. A. und Lapetina, E. G. (1993) Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 767-774
- Wu, G., Haynes, T. E., Li, H., Yan, W. und Meininger, C. J. (2001) Glutamine metabolism to glucosamine is necessary for glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis. *Biochem J* 353, 245–252
- Wu, G. und Meininger, C. J. (1993) Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells. *Am J Physiol* 265, H1965–H1971
- Wu, G. und Morris, S. M. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336, 1–17

- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S. H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J. Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. und Endou, H (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514, 291–302
- Yamasaki, K., Edington, H. D., McClosky, C., Tzeng, E., Lizonova, A., Kovesdi, I., Steed, D. L. und Billiar, T. R. (1998) Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 101, 967-971
- Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T. und Tohyama, M. (1997) Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem* 272, 10205-10211
- Yirrell, D. L., Roome, A. P., Darville, J. M., Ashley, C. R. und Harbour, J. (1983) Comparison of the continuous cell line 293 with human embryo kidney cells and human embryo fibroblast cells for the cultivation of ocular viruses. *J Clin Pathol* 36, 996-999
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, E. und Meruelo, D. (1991) Molecular cloning and characterization of a novel human gene homologous to the murine ecotropic retroviral receptor. *Virology* 185, 10-15
- Yu, J. G., Ishine, T., Kimura, T., O'Brien, W. E. und Lee, T. J. (1997) L-citrulline conversion to L-arginine in sphenopalatine ganglia and cerebral perivascular nerves in pig. *Am J Physiol* 273, H2192-H2199
- Yu, Y., Terada, K., Nagasaki, A., Takiguchi, M. und Mori, M. (1995) Preparation of recombinant argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase: expression of the enzymes in rat tissues. *J Biochem* 117, 952–957
- Yun, H. Y., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (1997) Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 2, 300-310
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. und Nathan, C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225-228

Zerangue, N. und Kavanaugh, M. P. (1996) ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *J Biol Chem* 271, 27991–27994

Zhou, X., Thamotharan, M., Gangopadhyay, A., Serdikoff, C. und Adibi, S. A. (2000) Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim Biophys Acta* 1466, 372-378

Zhu, M. Y., Iyo, A., Piletz, J. E. und Regunathan, S. (2004) Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim Biophys Acta* 1670(2), 156-164

Zimmermann, H., Kurzen, P., Klossner, W., Renner, E. L. und Marti, U. (1996) Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat. *J Hepatol* 25, 567-573

Zini, A., O'Bryan, M. K., Magid, M. S. und Schlegel, P. N. (1996) Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 55, 935-941

## 8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellen

Tabelle 1.1:	Charakteristika von NO-Synthasen.	6
Tabelle 1.2:	Transportsystemen für BAS	16
Tabelle 1.3:	Isoformen der Familie kationischer Aminosäure-Transporter (CAT)	18
Tabelle 1.4:	SLC15: Die Proton-Oligopeptid Cotransporter-Familie	23
Tabelle 1.5:	Identitäten zwischen Mitgliedern der POT-Familie (Botka et al., 2000).	23
Tabelle 2.1:	Plasmidkonstrukte mit den inserierten humanen CAT-Isoformen	48
Tabelle 2.2:	Gradient für die Auftrennung der Aminosäurederivate.	70
Tabelle 3.1:	Bekannte Glutamin-Transport-Systeme	89
Tabelle 9.1:	Berechnung der relativen Expression	209
Tabelle 9.2:	real time RT-PCR-Effizienzen.	210

### Abbildungen

Abbildung 1.1:	Reaktionsweg des Arginin-NO-Stoffwechsels.	7
Abbildung 1.2:	Arginin-Metabolismus in Säugerzellen	10
Abbildung 1.3:	Manipulationsmöglichkeiten für intrazelluläre ADMA-Spiegel	13
Abbildung 1.5:	Mechanismus des Glutamin-Transports durch SN1	21
Abbildung 1.4:	Arginintransport in verschiedenen Zelltypen	24
Abbildung 2.1:	Keine Mycoplasmen-Kontamination in HEK-GC-Zellen	38
Abbildung 2.2:	Reporter- und Quencher-Fluoreszenz-Farbstoffe von TaqMan Sonden.	53
Abbildung 2.3:	Prinzip von TaqMan Sonden in einer quantitativen real time PCR	54
Abbildung 2.4:	Oligonukleotid- und Sondenauswahl zur Eliminierung von Signalen durch mögliche Kontamination mit genomischer DNA	55
Abbildung 2.5:	Chromatogramm eines Gemischs aus 7 Aminosäuren nach Derivatisierung mit OPA (HPLC).	66

Abbildung 2.6:	Chromatogramm zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen in A673 Zellen nach Derivatisierung mit OPA (HPLC)	69
Abbildung 2.7:	Unterschiedliches Laufverhalten von <sup>14</sup> C-Citrullin in der Dünnschichtchromatographie.	72
Abbildung 3.1:	Repräsentative Darstellungen einer One-step quantitativen real time RT-PCR (qRT-PCR) eines 94 bp großen Fragments des humanen CAT-2A	74
Abbildung 3.2:	Quantitative Auswertung der mit qRT-PCR untersuchten mRNA-Expression der hCAT-Isoformen 1, 2A, 2B und 3 in EA.hy926 Endothelzellen	76
Abbildung 3.3:	Calcium-Abhängigkeit und Hemmbarkeit der endothelialen NO-Produktion in EA.hy926 Zellen.	78
Abbildung 3.4:	Abhängigkeit der NO-Produktion in EA.hy926 Endothelzellen von der eingesetzten Menge Superoxid-Dismutase (SOD) (RFL-6 Reporterzell-Assay)	80
Abbildung 3.5:	eNOS-Aktivität in EA.hy926 Endothelzellen ist abhängig von der Vorinkubation in 1 mM Lysin (RFL-6 Reporterzell-Assay, n=3-6,)	81
Abbildung 3.6:	Die Reduktion der eNOS-Aktivität ist nur bei Vorinkubation der EA.hy926 Zellen in Glutamin vorhanden (RFL-6 Reporterzell-Assay)	83
Abbildung 3.7:	Keine weitere Reduktion der eNOS-Aktivität in partiell depletierten EA.hy926 Zellen nach wiederholten Messungen (RFL-6 Reporterzell-Assay)	84
Abbildung 3.8:	Citrullin kann die eNOS-Aktivität in partiell depletierten EA.hy926 Endothelzellen wiederherstellen (RFL-6 Reporterzell Assay)	85
Abbildung 3.9:	Expression der Recyclingenzyme Argininosuccinat-Synthase und -Lyase in EA.hy926 Zellen (RT-PCR)	86
Abbildung 3.10:	Konversion von <sup>14</sup> C-Citrullin zu <sup>14</sup> C-Arginin in EA.hy926 Zellen (Dünnschichtchromatographie)	87
Abbildung 3.11:	Ausschließlich Substrate des System N Transporters SN1 induzieren eine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 30 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell Assay)	90
Abbildung 3.12:	Substrate anderer Transportsysteme induzieren keine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 30 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay)	91
Abbildung 3.13:	Substrate des System N Transporters SN1 induzieren eine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 120 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay)	92

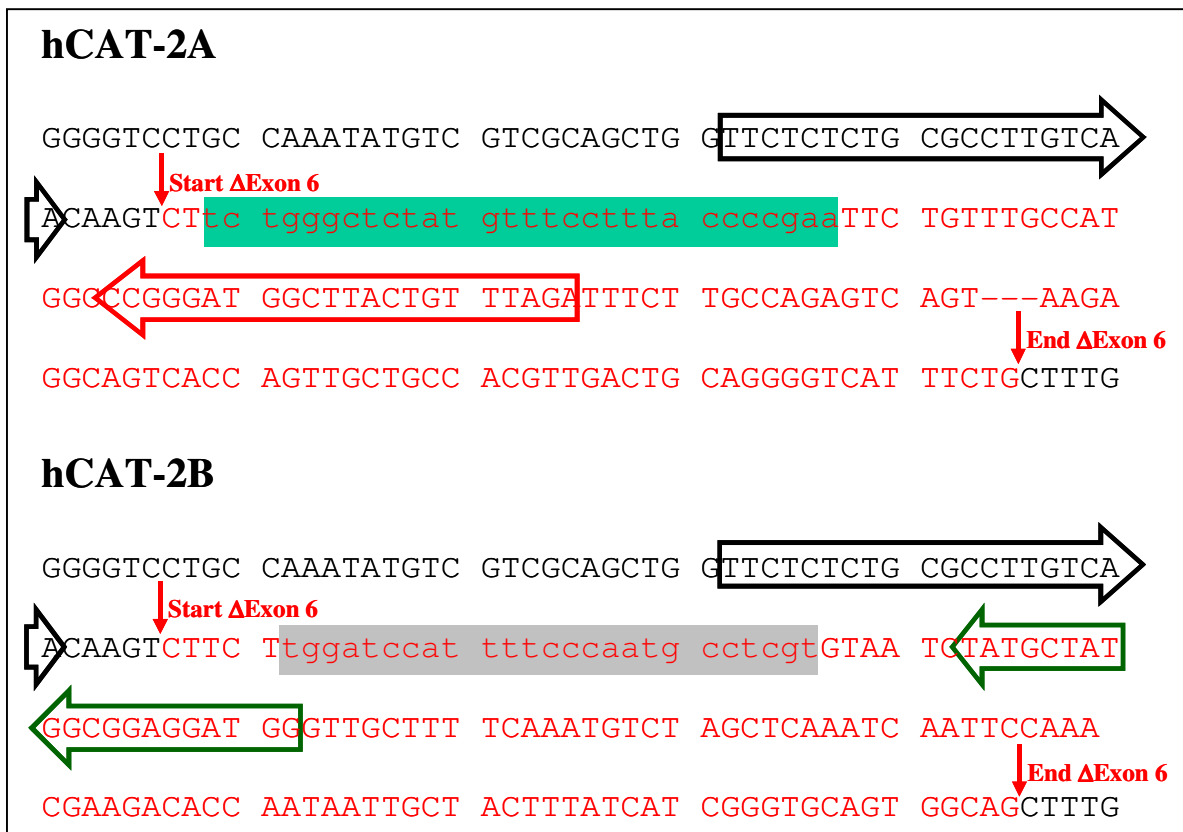
Abbildung 3.14:	Substrate anderer Transportsysteme induzieren keine Substratdepletion in EA.hy926 Zellen nach 120 min Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay)	93
Abbildung 3.15:	Expression des System N Transporters SN1 in EA.hy926 Zellen	95
Abbildung 3.16:	Verhältnis zwischen extra- und intrazellulären Glutamin-, Citrullin- und Argininkonzentrationen in EA.hy926 Zellen (HPLC)	96
Abbildung 3.17:	eNOS Substrat-Depletion durch den Proteasominhibitor MG132 in EA.hy926 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay)	98
Abbildung 3.18:	Expression des Peptid/Histidin-Transporters PHT1 in EA.hy926 Zellen (qRT-PCR)	100
Abbildung 3.19:	eNOS-Aktivität in primären HUVEC Endothelzellen unterscheidet sich mit der Dauer der Vorinkubation in 1 mM Lysin (RFL-6 Reporterzell-Assay)	101
Abbildung 3.20:	Citrullin kann die eNOS-Aktivität in partiell depletierten HUVEC Endothelzellen nur in Kombination mit Aspartat wiederherstellen (RFL-6 Reporterzell-Assay)	103
Abbildung 3.21:	Histidin, nicht aber Leucin oder MeAIB induziert eine Substratdepletion in HUVEC nach 30-minütiger Inkubation (RFL-6 Reporterzell-Assay).	104
Abbildung 3.22:	Expression des System N Transporters SN1 in HUVEC	105
Abbildung 3.23:	Expression verschiedener Peptid-Transporters in HUVEC (qRT-PCR)	106
Abbildung 3.24:	eNOS-Aktivität in ECV 304 N-III-2 ist abhängig von der Argininverfügbarkeit (RFL-6 Reporterzell-Assay)	108
Abbildung 3.25:	Citrullin kann die eNOS-Aktivität in partiell depletierten ECV 304 N-III-2-Zellen trotz Expression der Recyclingenzyme ASS und ASL nicht wiederherstellen (RFL-6 Reporterzell-Assay, RT-PCR)	110
Abbildung 3.26:	Quantitative Auswertung der mit qRT-PCR untersuchten mRNA-Expression der hCAT-Isoformen 1, 2A, 2B und 3 in A673 Neuroepitheliomzellen	112
Abbildung 3.27:	Calcium-Abhängigkeit und Hemmbarkeit der neuronalen NO-Produktion in A673 Zellen	113
Abbildung 3.28:	Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) in A673 Zellen	114
Abbildung 3.29:	Abhängigkeit der NO-Produktion in A673 Neuroepitheliomzellen von der eingesetzten Menge Superoxid-Dismutase (SOD) (RFL-6 Reporterzell-Assay).	116

Abbildung 3.30:	In A673 Zellen ist unter Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) mehr NO messbar, als bei Zugabe des intrazellulären Sauerstoff-Radikalfängers Tempol (RFL-6 Reporterzell-Assay)	117
Abbildung 3.31:	Keine weitere Reduktion der NO-Synthese in teilweise depletierten A673 Zellen bei längeren Inkubationszeiten oder wiederholten Messungen (RFL-6 Reporterzell-Assay).	119
Abbildung 3.32:	Verhältnis zwischen extra- und intrazellulären Glutamin-, Citrullin- und Argininkonzentrationen in A673 Zellen (HPLC)	121
Abbildung 3.33:	Expression des System N Transporters SN1 in A673 Zellen (qRT-PCR)	122
Abbildung 3.34:	Konversion von <sup>14</sup> C-Citrullin zu <sup>14</sup> C-Arginin in A673 und EA.hy926 Zellen im Vergleich (Dünnschichtchromatographie)	123
Abbildung 3.35:	Citrullin ist nicht in der Lage, die Reduktion der NO-Synthese in A673 Zellen wieder aufzuheben, Glutamin hat ebenfalls keinen Einfluss auf die NO-Produktion in diesen Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).	125
Abbildung 3.36:	Ausschließlich Histidin reduziert die NO-Produktion in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay)	126
Abbildung 3.37:	Der Proteasominhibitor MG132 hemmt die neuronale NO-Produktion in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay)	127
Abbildung 3.38:	Einfluss von lysosomalem und proteasomalem Proteinabbau in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay).	128
Abbildung 3.39:	Expression des Peptid/Histidin-Transporters PHT1 in A673 Zellen (qRT-PCR)	130
Abbildung 3.40:	Einfluss von Histidin am PHT1 in der Zellmembran und nicht in der lysosomalen Membran in A673 Zellen (RFL-6 Reporterzell-Assay)	131
Abbildung 3.41:	MG132, ein Inhibitor des Proteinabbaus, reduziert die extrazellulär messbaren Arginin-Konzentrationen aus A673 Zellen, Citrullin kann diese Reduktion wieder aufheben (HPLC)	132
Abbildung 3.42:	Calcium-Abhängigkeit und Hemmbarkeit der neuronalen NO-Produktion in TGW-nu-I Zellen	134
Abbildung 3.43:	Citrullin alleine, aber nicht in Kombination mit Aspartat ist in der Lage, die Reduktion der NO-Synthese in TGW-nu-I Zellen wieder aufzuheben (RFL-6 Reporterzell Assay)	135

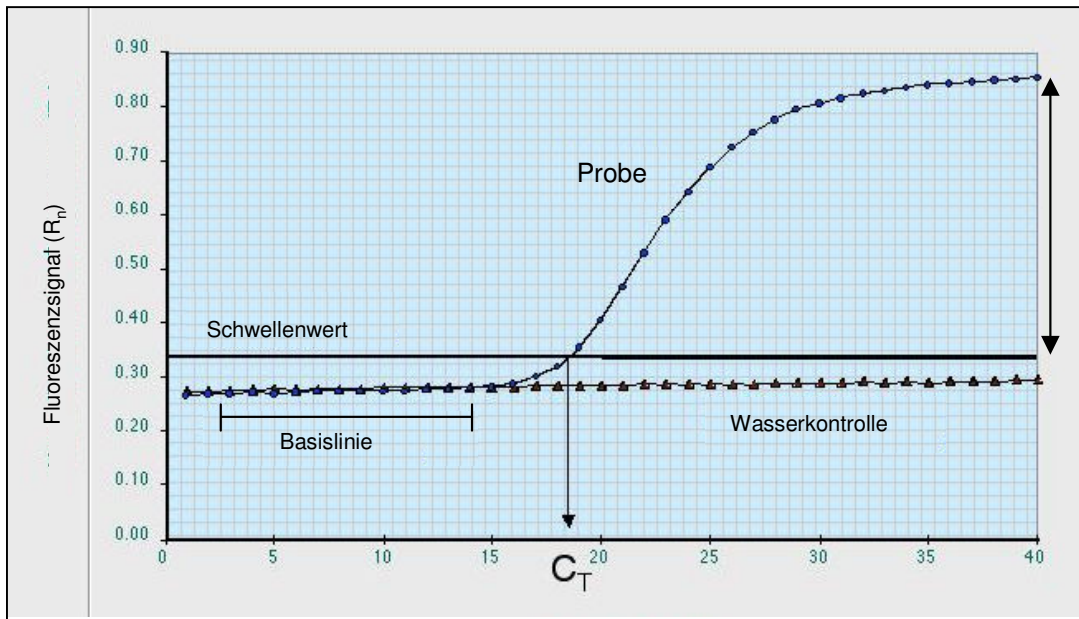


Abbildung 3.44:	Glutamin hat keinen Einfluss auf die NO-Synthese in TGW-nu-I Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).	136
Abbildung 3.45:	Expression des System N Transporters SN1 in TGW-nu-I Zellen (qRT-PCR).	137
Abbildung 3.46:	Histidin hemmt die NO-Synthese in TGW-nu-I Zellen (RFL-6 Reporterzell Assay).	138
Abbildung 3.47:	Expression des Peptid/Histidin-Transporters PHT1 in TGW-nu-I Zellen (qRT-PCR)	139
Abbildung 3.48:	NO-Produktion von nNOS-exprimierenden Zellen im Vergleich	140
Abbildung 4.1:	Kopplungsmodell von endothelialer NO-Produktion und Regeneration des Substrates Arginin aus Citrullin (nach Solomonson et al., 2003)	142
Abbildung 4.2:	Hypothese der Substratversorgung der endothelialen NOS in EA.hy926 Endothelzellen	144
Abbildung 4.3:	Hypothese der Substratversorgung der endothelialen NOS in primären HUVEC	145
Abbildung 4.4:	Hypothese der Substratversorgung der eNOS in der nicht-endothelialen Zelllinie ECV304 (stabil transfizierte Zellen)	146
Abbildung 4.5:	Hypothese der Substratversorgung der neuronalen NOS in A673 Neuroepitheliumzellen	154
Abbildung 4.6:	Hypothese der Substratversorgung der neuronalen NOS in TGW-nu-I Neuroblastomzellen	155
Abbildung 4.7:	Chemische Struktur von L-Arginin und seinen endogenen Analoga	161
Abbildung 4.8:	ADMA-Nachweis in EA.hy926 durch HPLC	162
Abbildung 9.1:	Auswahl von Oligonukleotiden und TaqMan Sonden für die Spleiß-Variante des SLC7A2, hCAT2A und hCAT2B.	207
Abbildung 9.2:	Darstellung einer typischen Amplifikationskurve einer real time RT-PCR-Reaktion	208

## 9 Anhang



**Abbildung 9.1: Auswahl von Oligonukleotiden und TaqMan Sonden für die Spleiß-Variante des SLC7A2-Gens, hCAT2A und hCAT2B.** Die beiden CAT-Isoformen CAT-2A und CAT-2B unterscheiden sich nur in dem Exon 6 kodierten Bereich. Isoform-spezifische TaqMan-Sonden (grün bzw. grau unterlegt) müssen daher aus diesem etwa 130 bp umfassenden Bereich stammen (unterschiedliche bp in rot). Die PCR-Amplifikation erfolgte durch Kombination eines gemeinsamen „sense-Strang“ Oligonukleotid (schwarzer Pfeil) aus dem identischen Exon 5 mit einem „antisense-Strang“ Oligonukleotiden (roter bzw. grüner Pfeil) aus dem jeweiligen isoform-spezifischen Exon 6.



**Abbildung 9.2: Darstellung einer typischen Amplifikationskurve einer real time RT-PCR-Reaktion.** Der Graph stellt das Fluoreszenzsignal ( $R_n$ ) gegenüber der Zyklusnummer dar. In frühen PCR-Zyklen ändert sich die Fluoreszenz kaum, hier definiert man die Basislinie der Amplifikation. Ein Anstieg der Fluoreszenz über die Basislinie zeigt die Detektion von akkumuliertem PCR-Produkt ( $\Delta R_n$ ). Durch Festsetzung des Schwellenwertes (Threshold) unterscheidet man zwischen signifikantem Anstieg der Fluoreszenz und dem Hintergrund. Der Parameter  $C_T$  (Threshold cycle) ist definiert als die Zyklusnummer, bei dem die Fluoreszenz den festgesetzten Schwellenwert übersteigt.

**Tabelle 9.1: Berechnung der relativen Expression.** Die relative Quantifizierung von Transkripten erfolgt immer anhand einer festgesetzten Kontroll-Probe. Als Beispiel werden nicht-transfizierte Zellen zur Kontrolle gegenüber den mit der zu untersuchenden cDNA transfizierten Zellen eingesetzt. Bei allen Proben wird zu Beginn die Differenz zwischen den  $C_T$ -Werten (Treshold cycle, siehe Abb. 9.2) des zu untersuchenden Transkripts (GOI, gene of interest) und des Gens zur Normierung (HKG, house keeping gene) berechnet ( $DC_T$ ). Die  $DC_T$ -Werte der Proben ( $PDC_T$ ) werden anschließend vom  $DC_T$ -Wert der Kontrolle ( $KDC_T$ ) subtrahiert ( $PDC_T - KDC_T$ ). Abschließend wird dieser Wert als negativer Exponent von 2 zur Berechnung der relativen Expression herangezogen ( $2^{-(PDC_T - KDC_T)}$ ). Diese Berechnung kann nur dann erfolgen, wenn die Effizienzen der Amplifikate vergleichbar sind (siehe Tabelle 9.2).

Probe	GOI $C_T$	HKG $C_T$	$DC_T$ <sup>1</sup>	$PDC_T - KDC_T$ <sup>2</sup>	Relative Expression <sup>3</sup>
1 (Kontrolle)	28	25	3	0	1
2	25	23	2	-1	2
3	24	26	-2	-5	32
4	27	24	3	0	1

<sup>1</sup>  $DC_T$ : Differenz der  $C_T$  Werte zwischen GOI (gene of interest) und HKG (House keeping gene):  $GOI C_T - HKG C_T$

<sup>2</sup>  $PDC_T - KDC_T$ : Differenz zwischen Probe  $DC_T$  und Kontrollwert  $DC_T$ .

<sup>3</sup> Die Relative Expression:  $2^{-(PDC_T - KDC_T)}$

**Tabelle 9.2: real time RT-PCR-Effizienzen.** Die entsprechenden Oligonukleotide, TaqMan Sonden, RT-PCR-Ansätze und RT-PCR-Profile sind in Kapitel 2.3.4.1 aufgeführt. Die Korrelationskoeffizienten, Steigungen und PCR-Effizienzen [%]<sup>1</sup> sind aus RNA-Standardreihen (ausgehend von 1:10 Verdünnungen) von der iCycler Software v2.3 berechnet worden. Um verschiedene Amplifikate vergleichbar quantifizieren zu können, wurden die PCR-Effizienzen [E]<sup>2</sup> außerdem nach der Formel  $E=[10^{-1/Steigung}]-1$  berechnet. Vergleichbare PCR-Bedingungen liegen vor, wenn  $\Delta E \leq 0,05^3$  ist. Im Vergleich zu hCAT-1 war diese Bedingung bei allen durchgeführten RT-PCR-Reaktionen erfüllt.

	Korrelations-Koeffizient	Steigung	PCR-Effizienz [%] <sup>1</sup>	PCR-Effizienz [E] <sup>2</sup>	$\Delta E$ (hCAT-1) <sup>3</sup>
hCAT-1	0,991	-3,208	105,0	-0,5121	-
hCAT-2A	1,000	-3,310	100,5	-0,5012	0,0109
hCAT-2B	1,000	-3,343	99,1	-0,4978	0,0143
hCAT-3	0,999	-3,359	98,5	-0,4961	0,0160
hSN1	0,998	-3,315	100,3	-0,5007	0,0114
hy <sup>+</sup> LAT-1	0,996	-3,318	100,2	-0,5004	0,0117
hy <sup>+</sup> LAT-2	1,000	-3,042	113,2	-0,5308	0,0187
hPHT1	0,998	-3,229	104,0	-0,5098	0,0023
hPHT2	0,997	-3,221	104,4	-0,5107	0,0014
hPepT1	1,000	-3,223	104,3	-0,5105	0,0016
hPepT2	1,000	-3,198	105,4	-0,5132	0,0011
hGAPDH	0,999	-3,253	102,9	-0,5072	0,0049

<sup>1</sup> PCR-Effizienz [%]: Berechnung der PCR-Effizienzen in % nach iCycler Software v2.3

<sup>2</sup> PCR-Effizienz [E]: Berechnung der PCR-Effizienzen nach Roche (technical note no. LC11/2000; Roche Molecular Biochemicals)

<sup>3</sup>  $\Delta E$  (hCAT-1): Differenz zwischen PCR-Effizienzen [E] ( $\leq 0,05$ )

## Teilveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit

### Abstracts

2002

Alexandra Simon, Marco Reining, and Ellen I. Closs (2002) L-Glutamine interferes with NO synthesis in EA.hy 926 endothelial cells, but not in A673 neuroepithelioma cells. 8. NO Forum der deutschsprachigen Länder Frankfurt/Main 3.-4. Oktober 2002

Alexandra Simon, Alice Habermeier, and Ellen I. Closs (2002) Comparison of the Substrate Supply for Different Nitric Oxide Synthetase (NOS) Isoforms in Human Endothelial EA.hy 926 and A673 Neuroepithelioma Cells. International Meeting on Transporters, Kloster Seeon 1.-5. September 2002

2003

Alexandra Simon, Alice Habermeier, Lars Plies, and Ellen I. Closs (2003) Influence of L-glutamine on NO synthesis in human EA.hy926 endothelial cells: disruption of the arginine recycling pathway? 44. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz 13.-15. März 2003, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 367, Suppl 1

Alexandra Simon, Alice Habermeier, Lars Plies, and Ellen I. Closs (2003) Substrates of the neutral amino acid transport system N interfere with the arginine supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. 8th International Congress on Amino Acids and Proteins, Rome, 5.-9. September 2003, Amino Acids, Vol. 25 Number 2

2004

Alexandra Simon, Alice Habermeier, and Ellen I. Closs (2004) Protein breakdown as an intracellular substrate source for neuronal nitric oxide synthase (nNOS). 45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz 09.-11. März 2004, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369 Suppl 1

Alexander Rotmann, Alexandra Simon, Ursula Martiné, and Ellen I. Closs (2004) Verminderung der hCAT-1-vermittelten Transportaktivität durch PKC in verschiedenen humanen Zelllinien. 45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz 09.-11. März 2004, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369 Suppl 1

Ellen I. Closs and Alexandra Simon (2004) Protein breakdown - a substrate source for nitric oxide synthases. ASBMB Annual Meeting and 8<sup>th</sup> IUBMB Conference of The American Society for Biochemistry & Molecular Biology, Boston, USA. FASEB J. 18

Alexandra Simon, Alice Habermeier, and Ellen I. Closs (2004) Interference of extracellular histidine with arginine supply to neuronal nitric oxide synthase (nNOS). International Meeting on Transporters, Cambridge 2.-5. September 2004

Alexandra Simon, Alice Habermeier, and Ellen I. Closs (2004) Einfluss von extrazellulärem Histidin auf die Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase (nNOS). 9. NO-Forum der deutschsprachigen Länder Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 5.-6. Oktober 2004

2005

Susanne H. Karbach, Alexandra Simon, and Ellen I. Closs (2005) Intra- and extracellular peptides – substrate sources for endothelial nitric oxide synthase (eNOS). 46. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz 15.-17. März 2005, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 371, Suppl 1

### Publikationen

Alexandra Simon, Lars Plies, Alice Habermeier, Ursula Martiné, Marco Reining, and Ellen I. Closs (2003) Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. Circ Res. Oct 31;93(9):813-20.

Ellen I. Closs, Alexandra Simon, Nicole Vekony, and Alexander Rotmann (2004) Plasma membrane transporters for arginine. J Nutr. Oct;134(10 Suppl):2752S-2759S; discussion 2765S-2767S.

### Auszeichnungen

Posterpreis International Meeting on Transporters, Kloster Seeon (2002)

Dagmar Eißner-Preis für Nachwuchswissenschaftlerinnen der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2004)

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.