

Aus dem Zentrum für Neurologie
Abteilung für allgemeine Neurologie
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. J. Dichgans

**Untersuchungen
zur Bedeutung von Arginin für die
induzierte NO-Synthese im ZNS**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von:
Boris Fischmann
aus
Calw**

2005

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. J. B. Schulz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wiesinger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Akronyme	3
1 Einleitung	4
1.1 NO in biologischen Systemen	4
1.1.1 NO-Synthasen	5
1.1.2 Chemie und Biochemie von NO	7
1.1.3 Physiologie und Pathophysiologie von NO	8
1.1.4 Regulation der NO-Synthese	11
1.2 NO und Arginin	11
1.2.1 Arginin, der Harnstoffzyklus und der Citrullin-NO-Zyklus	11
1.2.2 Arginin und die Regulation der NO-Synthese	13
1.2.3 Lokalisation von ASS und NOS im ZNS	14
1.3 Gliazellen	15
1.4 Die untersuchten Zellen	16
1.5 Ziel der Arbeit	18
2 Ergebnisse	20
2.1 Effekte von Aspirin®	21
2.1.1 Inhibition der NO-Synthese in N11-Zellen durch Aspirin®: Konzentrationsabhängigkeit	21
2.1.2 N11-Zellen	23
2.1.3 C6-BU-1-Zellen	28
2.1.4 Astroglia-Sekundärkulturen	31
2.1.5 Astrogliareiche Primärkulturen	32
2.2 Effekte von TGF- β	33
2.2.1 N11-Zellen	34
2.2.2 C6-BU-1-Zellen	36
2.2.3 Astroglia-Sekundärkulturen	37
2.2.4 Astrogliareiche Primärkulturen	38
2.3 Experimente zur Klärung der Frage auf welcher Stufe des Induktions- wegs Aspirin® die induzierte NO-Produktion hemmt.	39
2.4 Bestimmung der LDH-Aktivität	43
2.5 Effekte von Advanced Glycation Endproducts (AGEs)	43
2.5.1 Effekt von Carboxymethyllysin-Albumin allein	45
2.5.2 Einfluss von Carboxymethyllysin-Albumin auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion	45

2.5.3	Einfluss von Carboxymethyllysin-Albumin auf die durch LPS induzierte NO-Produktion	49
3	Diskussion	50
3.1	Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Aspirin®	50
3.2	Toxizität von Aspirin®	52
3.3	Wirkung von Aspirin®	53
3.3.1	Wirkung von Aspirin® auf ASS und iNOS	53
3.3.2	Wirkung von Aspirin® auf die Arginintransporter CAT-1 und CAT-2A in N11-Zellen	57
3.3.3	Reduziert Aspirin® die NO-Konzentration durch direktes Wegfangen von NO?	58
3.4	Wirkung von TGF- β	60
3.5	N11-Zellen als Microgliamodell zur Untersuchung von iNOS und Argininstoffwechsel	62
3.6	Die Arginininosuccinat-Lyase wird konstitutiv exprimiert	63
3.7	Wirkung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs)	64
4	Material und Methoden	67
4.1	Geräte, Materialien, Chemikalien	67
4.2	Zellkultur	70
4.2.1	Lösungen	70
4.2.2	Zelllinien	71
4.2.3	Primärkulturen	72
4.3	Stimulationsexperimente	74
4.4	Bestimmung der Nitritkonzentration	74
4.5	Bestimmung der LDH-Aktivität	75
4.5.1	Lösungen	75
4.5.2	Durchführung	76
4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	77
4.6.1	Lösungen	77
4.6.2	Probengewinnung (Protokoll 1)	77
4.6.3	Probengewinnung (Protokoll 2)	78
4.6.4	Proteinbestimmung	79
4.6.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	79
4.6.6	Blotting	80
4.6.7	Anfärbung	80
4.7	RT-PCR und Agarosegelelektrophorese	82
4.7.1	Lösungen	82
4.7.2	RNA-Isolierung	82
4.7.3	Reverse Transkription	82
4.7.4	Polymerase-Kettenreaktion	83
4.7.5	Agarosegelelektrophorese	85
5	Zusammenfassung	86
	Literaturverzeichnis	89

Abkürzungen und Akronyme

Abkürzungen, die nach den „Instructions to Authors 2002“ des „Journal of Neurochemistry“ nicht definiert werden müssen, wurden nicht in das Verzeichnis aufgenommen.

AGEs	advanced glycation endproducts
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthetase
BUDR	5-Brom-2'-desoxyuridin
CAT	Transporter für kationische Aminosäuren (<i>cationic amino acid transporter</i>)
CML	Carboxymethyllysine-Albumin (Modell für AGEs)
CPS	Carbamoylphosphat-Synthetase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NOS	Stickoxidsynthase (NO-Synthase)
eNOS	endotheliale NOS (NOS-3)
iNOS	induzierbare NOS (NOS-2)
nNOS	neuronale NOS (NOS-1)
NSAID	nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente (<i>non steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
OD	optische Dichte
OCT	Ornithin-Carbamoyltransferase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor- β
ZNS	Zentralnervensystem

Kapitel 1

Einleitung

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen retrospektiven, epidemiologischen Studien gezeigt, daß die Einnahme nicht-steroidaler antiinflammatorischer Medikamente wie Aspirin[®] oder Ibuprofen das Risiko an Alzheimer zu erkranken verringert [126, Stewart et al., 1997] [5, Anthony et al., 2000] [26, Broe et al., 2000]. In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten findet sich eine chronische Entzündungsreaktion, charakterisiert durch aktivierte Microglia, reaktive Astrocyten und verstärkte Expression inflammatorischer Cytokine, die mit den β -Amyloid-Ablagerungen assoziiert ist [106, Rogers et al., 1996] [28, Butterfield et al., 2002]. Ein wesentlicher Bestandteil von Entzündungsreaktionen, auch im ZNS, ist die Produktion von Stickstoffmonoxid, das aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird [49, Heales et al., 1999] [89, Murphy, 2000] [135, Wiesinger, 2001]. Außerdem wurde in den ZNS-Läsionen von Alzheimer-Patienten eine vermehrte Bildung sogenannter „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs), das sind oxidierte Reaktionsprodukte von Zuckern und Proteinen, nachgewiesen [87, Münch et al., 1997] [127, Takeda et al., 1998]. Eine wechselseitige Beeinflussung aller genannten Komponenten ist wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Aspekte der Regulation der NO-Produktion in kultivierten Gliazellen unter dem Einfluß von Aspirin[®], Cytokinen und AGEs untersucht.

1.1 NO in biologischen Systemen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges, lipophiles, gasförmiges Radikal, das als toxischer Bestandteil bei Verbrennungsprozessen zur Luftverschmutzung beiträgt. Es ist aber auch eine biologisch bedeutsame Substanz mit vielfältigen physiologischen Funktionen und pathophysiologischen Implikationen.

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden NO-Donoren wie Nitroglycerin zur Behandlung von Angina Pectoris und Hypertonie eingesetzt, jedoch ohne dass NO als der eigentliche Wirkstoff erkannt war. Der Wirkmechanismus wurde erst von Robert Furchgott und Louis J. Ignarro aufgeklärt. Sie berichteten im Jahre 1980, dass das Endothel der Blutgefäße einen diffusiblen Vasodilatator produziert, den sie zunächst als EDRF (endothelium derived relaxing factor) bezeichneten, bevor er 1987 als NO identifiziert wurde [57, Ignarro et al.,1999].

Nachdem NO als biologisch aktive Substanz erkannt war, stieg die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema exponentiell an und es wurden weitere Funktionen entdeckt. Neben der Beteiligung an der Regulation des Blutgefäßtonus wirkt NO als Neurotransmitter und ist als toxische Substanz Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr gegen Pathogene wie Bakterien oder Krebszellen [72, Kröncke et al., 1995]. Entsprechend der weiten Verbreitung im Organismus spielt NO auch bei zahlreichen pathophysiologischen Prozessen eine Rolle. Dazu zählen neurodegenerative Erkrankungen, Schlaganfall, Arteriosklerose, Sepsis und Diabetes [73, Kröncke et al., 1998]. Um die Pathogenese dieser Krankheiten zu verstehen und eventuelle therapeutische Ansätze zu finden, ist es notwendig, die biochemischen Grundlagen der NO-Produktion aufzuklären.

1.1.1 NO-Synthasen

Die NO-Synthasen katalysieren die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO, nach dem in Abbildung 1.1 gezeigten Schema. Die NO-Synthasen haben in der monomeren Form eine Molekülmasse von 131–161 kDa, ihre enzymatische Aktivität entfalten sie aber erst als Homodimer. Sowohl in einem Teil der molekularen Struktur als auch beim Reaktionsmechanismus bestehen Ähnlichkeiten mit den Cytochrom-

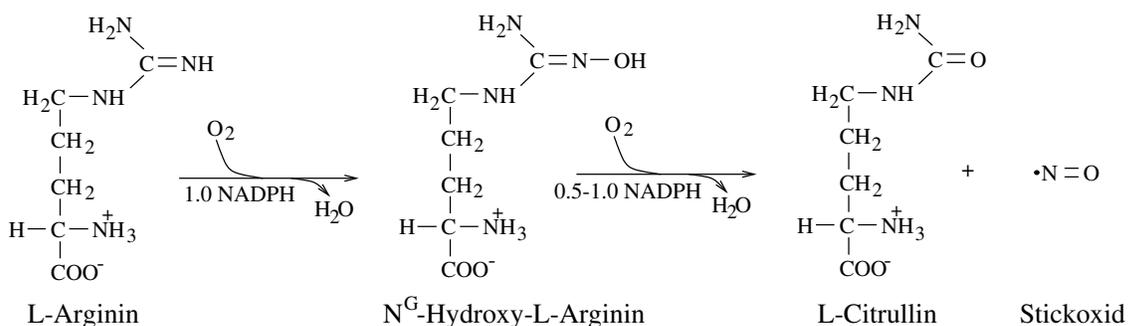


Abbildung 1.1: Mechanismus der NO-Synthese

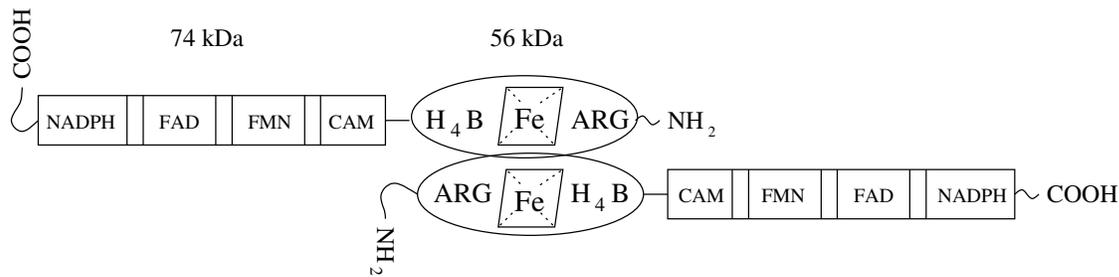


Abbildung 1.2: Modell der iNOS (nach Stuehr, 1997) (H₄B = Tetrahydrobiopterin; CAM = Calmodulin)

P450-Reduktasen [81, Marletta, 1994] [1, Alderton et al., 2001].

Die Oxidation von Arginin zu Citrullin und NO läuft in zwei Monooxygenase-Schritten ab. Beim ersten Schritt handelt es sich um eine Zweielektronen-Oxidation von L-Arginin, beim zweiten um eine Dreielektronen-Oxidation des Zwischenproduktes N^G-Hydroxy-L-Arginin. Beide Schritte werden von der NOS katalysiert, deren Tertiärstruktur in eine Oxygenase-Domäne und eine Reduktase-Domäne aufgeteilt werden kann [82, Mayer und Hemmens, 1997]. Die N-terminale Oxygenase-Domäne enthält Häm, Tetrahydrobiopterin und die Bindungsstelle für L-Arginin, außerdem vermittelt sie bei der induzierbaren Isoform die Dimerisation. Die C-terminale Reduktase-Domäne enthält Calmodulin, FAD, FMN und die Bindungsstelle für das Co-Substrat NADPH [82, Mayer und Hemmens, 1997]. Abbildung 1.2 zeigt am Beispiel der iNOS ein Modell der NO-Synthase in ihrer aktiven, dimeren Form.

Es kommen drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase vor, die genetisch festgelegt sind: es gibt eine induzierbare Form (iNOS = NOS-2) und zwei konstitutive Formen, die neuronale NOS (nNOS = NOS-1) und die endotheliale NOS (eNOS = NOS-3), zusätzlich finden sich alternative Spleiss-Varianten der einzelnen Gene, über deren biologische Funktion bisher nur wenig bekannt ist [1, Alderton et al., 2001] [22, Boissel et al., 2003]. Die verschiedenen Isoformen lassen sich nicht ohne weiteres bestimmten Gewebe- oder Zelltypen zuordnen. Auch die Kriterien „induzierbar“ oder „konstitutiv“ verlieren mit neueren Erkenntnissen immer mehr an Eindeutigkeit. Beispielsweise wurden in Astrocyten alle drei Isoformen gefunden und die NOS-1 und die NOS-3 werden auch auf der Expressionsebene reguliert [89, Murphy, 2000] [31, Catania et al., 2003]. Vereinfacht läßt sich jedoch sagen, daß die nNOS in Neuronen und die eNOS in Endothelzellen als jeweils paradigmatische Enzyme angesehen werden können, während die iNOS in der Regel nicht in gesundem Gewebe vorkommt,

sondern erst nach Induktion durch pathologische Reize in Macrophagen, Astrocyten, Kupffer-Zellen, Endothelzellen, Chondrocyten u.a. exprimiert wird [1, Alderton et al., 2001].

Die beiden konstitutiven Formen nNOS und eNOS werden durch die Bindung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes und damit indirekt durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert. Bei der induzierbaren Form ist Calmodulin auch bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationen fest an das Enzym gebunden. Die Regulation erfolgt hier primär auf der Stufe der Gen-Expression, außerdem ist die Aktivität vergleichsweise hoch; nach Expression der iNOS werden also über einen langen Zeitraum große Mengen an NO produziert. Es gibt noch eine Vielzahl weiterer Regulationsmechanismen für die NO-Synthasen auf allen Ebenen von der Gen-Transkription bis zur kovalenten Modifizierung und allosterischen Regulation des exprimierten Enzyms [1, Alderton et al., 2001] (siehe auch Kap. 1.1.4).

1.1.2 Chemie und Biochemie von NO

NO reagiert direkt mit prosthetischen Eisengruppen von Enzymen, wodurch diese sowohl gehemmt als auch aktiviert werden können. Einen großen Teil seiner biologischen Wirkungen entfaltet NO jedoch indirekt durch Reaktion mit Superoxid (O_2^-) oder molekularem Sauerstoff zu reaktiven Stickstoffverbindungen (ONOO^- , N_2O_3). Zu diesen indirekten Wirkmechanismen zählen:

- Nitrierung von Proteinen an Tyrosin
- Reaktion mit Thiolen
- Reaktion mit DNA
- ADP-Ribosylierung von Enzymen

Beispiele für die biologische Wirkung von NO sind die Schädigung von Mitochondrien und das Auslösen von Apoptose durch Bindung an Fe-S oder Häm enthaltende Enzyme der Atmungskette [49, Heales et al., 1999] oder die Beeinflussung der Genexpression durch Nitrosylierung und Nitrierung von Transkriptionsfaktoren. Die wichtigste physiologische Funktion ist aber die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch Bindung an deren Häm-Gruppe. [9, Baltrons et al., 2003] [41, Friebe und Koesling, 2003].

1.1.3 Physiologie und Pathophysiologie von NO

Eine wichtige Rolle spielt NO bei der Regulation des Gefäßtonus. NO wird vom Gefäßendothel produziert, diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen und bindet dort an die lösliche Isoform der Guanylatcyclase, die dadurch aktiviert wird. Die Produktion von cGMP durch die Guanylatcyclase führt schließlich zur Relaxation der glatten Muskulatur. Kommt es durch arteriosklerotische Veränderungen zu einem Untergang des Endothels, fällt dessen vasodilatierende Wirkung weg und es resultiert eine Vasokonstriktion [92, Napoli, 2002]. Beim Krankheitsbild der Sepsis hingegen wird durch in der Blutbahn zirkulierende Bakterienbestandteile die iNOS in Macrophagen in hoher Menge exprimiert und es kommt zu einer Überproduktion von NO. Das in der Blutbahn gebildete NO diffundiert in die Gefäßwand und bewirkt dort eine Vasodilatation mit nachfolgendem Blutdruckabfall und Minderdurchblutung der Organe [128, Thiernemann, 1997] [58, Ignarro, 2002].

Weiterhin ist NO ein wichtiger Mediator der Wundheilung [136, Witte und Barbul, 2002] und ist möglicherweise an der Abstoßungsreaktion von Organtransplantaten und Gelenk-Endoprothesen beteiligt. Ebenso wurde im Rahmen vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Crohn und rheumatoide Arthritis, eine Induktion der iNOS beschrieben [73, Kröncke et al., 1998].

Auch die Funktion von NO als Neurotransmitter wurde vorgeschlagen. 1-2% aller Neurone im Gehirn exprimieren die konstitutive nNOS. Die Fortsätze dieser Neurone sind stark verzweigt und beeinflussen, sowohl in der Zellkultur als auch in intakten Tieren, die Mehrheit aller anderen Neurone [38, Egberongbe et al., 1994]. Die nNOS kann präsynaptisch lokalisiert sein und wird durch Ca^{2+} aktiviert, das durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle eingeströmt ist. Das Enzym kommt aber auch postsynaptisch vor, der zur Aktivierung notwendige Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ist hier Folge der Wechselwirkung des Neurotransmitters Glutamat mit dem NMDA-Rezeptor [119, Schulz et al., 1995]. Man vermutet, dass NO an der Regulation des Gedächtnisses (long term potentiation/-depression) und dem räumlichen Lernvermögen, also an der Plastizität des Gehirns, beteiligt ist [52, Hölscher, 1997] [24, Bon und Garthwaite, 2003]. Auch im peripheren Nervensystem wird die nNOS gefunden, hier vor allem im Magen-Darm-Trakt, wo sie die Peristaltik steuert. NO scheint somit der Transmitter der sogenannten „NANC-Nerven“ zu sein

(NANC: non adrenergic non cholinergic) [17, Bennett, 1997] [19, Boeckxstaens und Pelckmans, 1997].

Der nNOS wird eine Bedeutung in der Pathophysiologie der cerebralen Ischämie zugeschrieben. Beim ischämischen Insult wird in den ischämischen Arealen eine erhöhte Glutamatkonzentration beobachtet, wodurch der NMDA-Rezeptor und in Folge die nNOS unkontrolliert aktiviert werden. Die übermäßige NO-Produktion führt dann zu einem Untergang der benachbarten Neurone, während die nNOS-positiven Neurone aus bisher ungeklärten Gründen überleben [119, Schulz et al., 1995]. Dass NO als cytotoxisches Effektormolekül eine wichtige Rolle in der zellulären Immunreaktion spielt, gilt bei Nagern als gesichert. Auch beim Menschen wurde bei einer Reihe von Infektionskrankheiten eine Expression der iNOS gefunden [73, Kröncke et al., 1998]. In in vitro-Experimenten wurde gezeigt, dass die Abtötung von *Mycobacterium avium-intrazellulare*, *Trypanosoma cruzii* und *Leishmania major* durch aktivierte menschliche Macrophagen auf der Wirkung von NO beruht. Außerdem wurde eine Allelvariante des iNOS-Gens beschrieben, die von pathophysiologischer Bedeutung für die Resistenz gegen Malaria ist [73, Kröncke et al., 1998]. Trotz der Beweise für die Induktion der iNOS auch in der menschlichen Immunreaktion ist es noch immer umstritten, welche Rolle sie dabei spielt. Interessant ist auch, dass bei vielen entzündlichen Prozessen die iNOS nicht nur in den Zellen des Immunsystems exprimiert wird, sondern vor allem auch in Zellen epithelialen Ursprungs. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass eine Barriere gegen invasive Pathogene gebildet wird oder durch Induktion von Cytostase oder Apoptose in Immunzellen die Immunreaktion lokal herabreguliert und so die Gewebeschädigung durch aktivierte Macrophagen und neutrophile Granulocyten gering gehalten wird [73, Kröncke et al., 1998].

Auch im ZNS wird die iNOS bei Infektionen, Tumoren, chronisch-entzündlichen und neurodegenerativen Krankheiten gefunden. Von besonderem Interesse für die Wissenschaft sind hierbei Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und Morbus Parkinson, deren Pathogenese noch weitgehend unbekannt ist und für die es bisher keine befriedigende Therapie gibt [119, Schulz et al., 1995].

Das histologische Korrelat der Demenz vom Alzheimer-Typ ist gekennzeichnet durch extrazelluläre Ablagerungen von β -A4-Amyloid in sogenannten „senilen Plaques“, Alzheimer-Fibrillen im Cytoplasma von Nervenzellen und eine Amyloid-

Angiopathie. Der Beginn der Erkrankung liegt vermutlich 30–40 Jahre vor den ersten klinischen Symptomen [60, Jellinger, 1999]. Es werden eine Vielzahl pathogenetischer Faktoren diskutiert, die zu einer chronischen Entzündungsreaktion führen. Deren Folge ist eine fortschreitende Zerstörung des neuronalen Cytoskellts, mit daraus resultierendem Verlust von Synapsen und Neuronen

[60, Jellinger, 1999]. Eine zentrale Rolle scheint dabei oxidativer Stress in Zusammenhang mit einer erhöhten AGE-Bildung zu spielen [133, Wang et al., 2002] [88, Münch et al., 2003]. Mehrere Befunde deuten auf eine Beteiligung von NO hin: β -A4-Amyloid und das gliale Protein S-100- β , das bei der Alzheimer-Erkrankung überexprimiert ist, induzieren die iNOS in glialen Zellen [53, Hu et al., 1998] [89, Murphy, 2000] [141, Xie et al., 2002]. AGEs als wesentlicher Teil der pathogenetischen Kaskade induzieren NF- κ B, einen Transkriptionsfaktor für das iNOS-Gen [87, Münch et al., 1997]. Tatsächlich wurde bei immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen an Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine Expression der iNOS in Gliazellen und in Neuronen nachgewiesen [51, Heneka et al., 2001] [42, Haas et al., 2002]. Auch eine Schädigung der mitochondrialen Atmungskette und die Nitrierung von Tyrosin-Resten in Proteinen, beides Folgen einer Überproduktion von NO, wurden in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden [49, Heales et al., 1999] [30, Castegna et al., 2003]. Exzessive Freisetzung von excitatorischen Toxinen wie Glutamat und eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase könnten zusätzlich die NO-Produktion in Neuronen übermäßig steigern [60, Jellinger, 1999] [125, Stewart und Heales, 2003].

Auch für die Multiple Sklerose und die Parkinson-Krankheit liegen Untersuchungen vor, deren Ergebnisse NO als pathogenetischen Faktor implizieren [49, Heales et al., 1999] [89, Murphy, 2000] [139, Wu et al., 2002] [6, Arimoto und Bing, 2003].



1.1.4 Regulation der NO-Synthese

Die Regulation der konstitutiven nNOS und eNOS erfolgt in erster Linie über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex, während bei der Ca^{2+} -unabhängigen iNOS die Steuerung der Gen-Expression über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT1 eine zentrale Rolle spielt. Induktoren des iNOS-Gens sind proinflammatorische Cytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β u.a.), LPS, reaktive Sauerstoffverbindungen, das HIV-coat-protein, S100 und β -Amyloid. Inhibitoren sind IFN- β , Angiotensin II, IL-4, IL-10, TGF- β und sogar Cannabis [89, Murphy, 2000] [29, Cabral et al., 2001]. Durch TGF- β wird die Halbwertszeit der iNOS-mRNA, die normalerweise 2–3 Stunden beträgt, verkürzt [89, Murphy, 2000]. Außerdem werden die NO-Synthasen im Sinne eines negativen Feedbacks durch ihr Produkt NO inhibiert. NO hemmt die Transkription des iNOS-Gens und die Dimerisation der iNOS zum aktiven Enzym und es hemmt die Enzymaktivität durch Bildung eines stabilen Fe^{2+} -NO-Komplexes in der Häm-Gruppe der NO-Synthasen [89, Murphy, 2000] [1, Alderton et al., 2001]. Letzteres trifft vor allem auf die nNOS zu, von der bis zu 95% in der reduzierten, inaktiven Form vorliegen [1, Alderton et al., 2001]. Auch eine Phosphorylierung der konstitutiven NO-Synthasen durch verschiedene Proteinkinasen wurde beschrieben, wodurch die Enzymaktivität sowohl inhibiert als auch verstärkt werden kann [1, Alderton et al., 2001]. Ein weiterer Kontrollmechanismus besteht vermutlich darin, dass die NO-Produktion über die Versorgung der NO-Synthase mit ihrem Substrat Arginin reguliert wird. Die Grundlagen dieser Hypothese sollen im nächsten Abschnitt erläutert werden.

1.2 NO und Arginin

1.2.1 Arginin, der Harnstoffzyklus und der Citrullin-NO-Zyklus

Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure, deren de novo-Synthese im menschlichen Körper zwar möglich ist, aber nur bei gesunden Individuen ausreicht, den Bedarf zu decken. Bei gesteigertem Bedarf wie z.B. bei Krankheit oder während des Wachstums, muss Arginin über die Nahrung zugeführt werden. Die Synthese von Arginin findet im Harnstoffzyklus statt (Abbildung 1.3). Die Ausstattung mit den Enzymen des Harnstoffzyklus variiert von Gewebe zu Gewebe, entsprechend

kommen ihm unterschiedliche Aufgaben zu. In der Leber dient er durch die hohe Aktivität der Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS), der Ornithin-Carbamoyltransferase (OCT) und der Arginase der Stickstoffentsorgung, während in der Niere, in der diese Enzyme nur schwach oder gar nicht exprimiert sind, die Argininsynthese aus Citrullin dominiert.

Da die beiden mitochondrialen Enzyme CPS und OCT, die die Synthese von Citrullin aus Ornithin, NH_4^+ und HCO_3^- katalysieren, ausschließlich in der Leber, im Dünndarm und zu einem kleinen Teil im Dickdarm vorkommen, blieb es lange Zeit ein Rätsel, woher das Citrullin im ZNS stammt. Heute weiß man, dass Citrullin Koproduct der neuronalen NO-Synthese ist und möglicherweise als Teil eines Citrullin-NO-Zyklus (Abbildung 1.3) zur Versorgung der NO-Synthese mit ihrem Substrat Arginin beiträgt [85, Morris, 2000] [135, Wiesinger, 2001] [56, Husson et al., 2003]. Die Synthese von Arginin aus Citrullin wird von zwei Enzymen katalysiert, der Argininosuccinat-Synthetase (ASS) und der Argininosuccinat-Lyase (ASL). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Reaktion von Citrullin und Aspartat zu Argininosuccinat, katalysiert durch die ASS.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt in diesem Zusammenhang ist die Aufnahme von Arginin aus dem Extrazellulärraum. Häufig werden von einer Zelle nicht alle Enzyme des Citrullin-NO-Zyklus exprimiert, so dass die NO-Produktion und das Recycling von Citrullin zu Arginin voneinander getrennt in verschiedenen spezialisierten

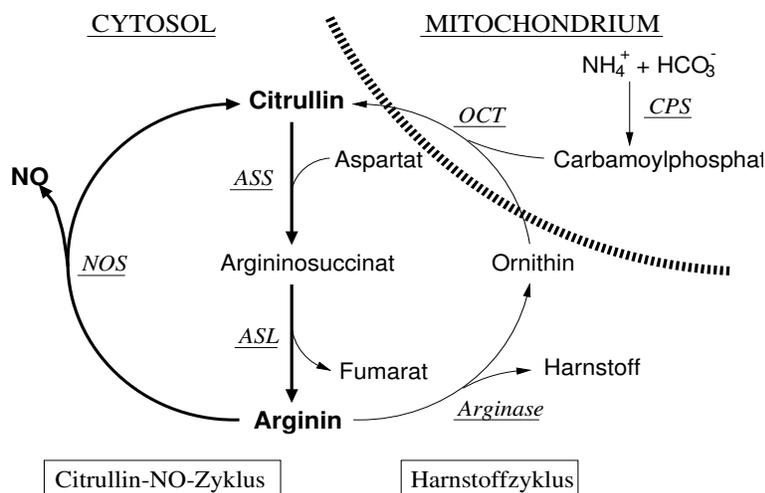


Abbildung 1.3: Der Argininmetabolismus als Schnittstelle von Citrullin-NO-Zyklus und Harnstoffzyklus (modifiziert nach Wiesinger, 2001 [135])

Zellen ablaufen (siehe Kap. 1.2.3). Für einen solchen interzellulären Citrullin-NO-Zyklus ist jedoch der Transport von Arginin und Citrullin notwendig. Es gibt verschiedene Transportsysteme, die den Transport von Arginin durch die Zellmembran ermöglichen, das wichtigste ist das sogenannte System y^+ . Dieses System bevorzugt die kationischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin. Es setzt sich aus einer Familie von Transportproteinen, den sogenannten CATs („cationic amino acid transporter“), zusammen. Von besonderer Bedeutung für die iNOS ist dabei vor allem CAT-2 und nach den bisherigen Erkenntnissen insbesondere die Splicevariante CAT-2B [35, Closs, 2002].

1.2.2 Arginin und die Regulation der NO-Synthese

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Produktion von NO durch die Verfügbarkeit von Arginin reguliert wird. Ein auffälliger Befund ist, dass in vielen Zellen unter Bedingungen, unter denen die iNOS induziert wird, zusätzlich der Arginintransport und die ASS hochreguliert werden. Eine Hochregulation der ASS wurde in Gefäßmuskelzellen [47, Hattori et al., 1994], Macrophagen [96, Nussler et al., 1994], menschlichen Tumorzelllinien [97, Nussler et al., 1996], kultivierten Astrocyten [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998], Microgliazellen [50, Heneka et al., 1999], [66, Kawahara et al., 2001], PC12-Zellen [143, Zhang et al., 2000] und in retinalen Pigmentepithelzellen [71, Koga et al., 2003] gefunden. In vivo wurde eine gemeinsame Hochregulation/Induktion von iNOS und ASS unter pathologischen Bedingungen gefunden [51, Heneka et al., 2001] [70, Koga et al., 2002] [55, Hukkanen et al., 2003].

Der Arginintransport wird durch Behandlung mit Immunstimulantien in Macrophagen [21, Bogle et al., 1992] [61, Kakuda et al., 1999], Gefäßmuskelzellen [14, Baydoun et al., 1999] [48, Hattori et al., 1999], Endothelzellen [100, Posch et al., 1999], kultivierten Astrocyten [Schmidlin und Wiesinger, 1994 [113], 1995 [114]] und in Microgliazellen [66, Kawahara et al., 2001] hochreguliert.

Dass der ASS eine funktionelle Bedeutung für die NO-Produktion zukommt, wurde an Maus-Astroglia-Kulturen gezeigt: die Inhibition des Enzyms durch α -Methyl-D,L-aspartat hat hier eine Verringerung der NO-Produktion durch die iNOS zur Folge [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998]. Dabei ist zu bedenken, dass die intrazelluläre Argininkonzentration von 100 μM bis 800 μM variiert, während der K_M -Wert der NO-Synthasen für Arginin zwischen 1 und 10 μM liegt. Die NO-Synthese müsste

also eigentlich unter Substratsättigung stattfinden. Dieser Widerspruch könnte dadurch zu erklären sein, dass die NOS durch intrazelluläre Kompartimentierung vom allgemeinen zellulären Argininpool ferngehalten wird und dadurch eine Regulation durch den Citrullin-NO-Zyklus und den Arginintransport erreicht wird. Tatsächlich wurden sowohl in Macrophagen als auch in Endothelzellen zwei voneinander getrennte Argininpools gefunden [34, Closs et al., 2000]. Außerdem ist die eNOS in den sogenannten Caveolae der Plasmamembran von Endothelzellen direkt mit der ASS [40, Flam et al., 2001] [122, Solomonson et al., 2003] und dem Arginintransporter [83, McDonald et al., 1997] assoziiert.

Auch für den Arginintransporter CAT-2 wurde kürzlich die vermutete funktionelle Bedeutung bei der NO-Produktion bestätigt: Neben der schon bekannten Koinduktion von iNOS und CAT-2B wurde nun bei Experimenten mit CAT-2-knock-out Mäusen gezeigt, dass die NO-Produktion durch die iNOS bei CAT-2 defizienten Macrophagen und Astrocyten stark eingeschränkt war [93, Nicholson et al., 2001] [94, Nicholson et al., 2002] [80, Manner et al., 2003].

Neben der Kontrolle der NO-Produktion könnte die Argininversorgung der NOS auch deren Produktspezifität bestimmen, da bei Argininmangel von der NOS nicht mehr NO, sondern O_2^- , das mit NO zu Peroxinitrit reagiert, gebildet wird [101, Pou et al., 1992] [140, Xia und Zweier 1997] [1, Alderton et al., 2001]. Durch Peroxinitrit wird ein großer Teil der schädlichen biologischen Wirkungen von NO vermittelt (siehe Kap. 1.1.2).

1.2.3 Lokalisation von ASS und NOS im ZNS

Interessanterweise unterscheidet sich im ZNS die Lokalisation der ASS stark von der der NOS. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die ASS im gesunden Rattenhirn in erster Linie ein neuronales Enzym ist [91, Nakamura et al., 1991] und dass die Kolokalisation von ASS und nNOS in derselben Zelle auf einen kleinen Teil der Neurone beschränkt ist [7, Arnt-Ramos et al., 1992]. In gemischten Glia-Primärkulturen der Ratte wird durch Behandlung mit LPS und IFN- γ sowohl die ASS als auch die iNOS induziert, dabei wird die ASS in Astrocyten und die iNOS in Microglia exprimiert. Kolokalisation von ASS und iNOS ist die Ausnahme [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998]. Im Gegensatz zu den Verhältnissen im Nagergehirn wurde in Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine Kolokalisation von ASS und iNOS

sowohl in Astrocyten als auch in Microglia gefunden. In den Kontrollgehirnen war keines der beiden Enzyme detektierbar [51, Heneka et al., 2001].

Die räumliche Trennung der NO-Produktion und des Recyclings von Citrullin macht einen interzellulären Transport von Citrullin und Arginin notwendig. Tatsächlich sind alle Zelltypen des ZNS in der Lage, sowohl Citrullin als auch Arginin zu transportieren [113, Schmidlin und Wiesinger, 1994] [118, Schmidlin et al., 2000].

Eine ausführliche Übersicht zum Thema NO und Arginin im ZNS findet sich im Artikel von Wiesinger (2001) [135].

1.3 Gliazellen

Im Gehirn kommen neben Nervenzellen weitere Zelltypen vor, die unter dem Begriff Neuroglia zusammengefasst werden. Dies sind Astrocyten, Oligodendroglia, Ependymzellen und Microglia. Bis auf die Microglia sind diese Zellen wie auch die Nervenzellen ektodermalen Ursprungs. Die Microglia leitet sich von fetalen Macrophagen ab und entstammt somit dem Mesoderm [77, Ling und Wong, 1993] [64, Kaur et al., 2001].

Astrocyten sind große sternförmige Zellen mit vielen Zellfortsätzen, die ein Drittel des menschlichen Gehirnvolumens einnehmen [75, Leonhardt, 1985]. Sie besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose. Der Raum zwischen den Nervenzellfortsätzen in der Grauen Substanz wird nahezu vollständig von Astrocyten ausgefüllt. Mit ihren Fortsätzen trennen sie die synaptischen Endigungen voneinander und sorgen für das Entfernen der Neurotransmitter. Außerdem bilden sie die sogenannte Gliagrenzmembran (Membrana limitans gliae), die das Hirngewebe gegen die Hirnhäute und die Blutgefäße abgrenzt. Astrocyten sind für den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn zuständig und versorgen die Neuronen mit Energiemetaboliten. Zusätzlich regulieren sie die Konzentration extrazellulärer Ionen und sind in der Lage Neurotransmitter sowohl aufzunehmen als auch auszuschütten, dadurch interagieren sie direkt mit den umliegenden Neuronen und modulieren deren Aktivität. [74, Kuffler und Nicholls, 1966] [123, Somjen, 1979] [10, Barres, 1991] [45, Hansson und Rönnbäck, 2003].

Oligodendrocyten kommen vorwiegend in der weißen Substanz vor und bilden dort mit ihren lamellenartigen Fortsätzen die Myelinscheiden um die Axone der Nervenzellen. In der Grauen Substanz kommen sie als kleine Zellen mit wenigen, kaum verzweigten Fortsätzen vor, die den Nervenzellen unmittelbar anliegen und deren Funktion noch unbekannt ist [13, Baumann und Pham-Dinh, 2001].

Ependymzellen bilden den einschichtigen Zellverband, der die Liquorräume des ZNS auskleidet. Apikal besitzen diese Zellen Kinocilien, die zur Liquorzirkulation beitragen [104, Reichenbach und Robinson, 1995].

Microgliazellen machen bis zu 20% der nicht-neuronalen Zellen des ZNS aus. Sie befinden sich im gesunden Gehirn in einem Ruhezustand und erscheinen dann als kleine Zellen mit fein verzweigten Zellfortsätzen. Nach ihrer Aktivierung, zum Beispiel durch Verletzung oder Infektion, verwandeln sie sich zu den gewebetypischen Macrophagen des ZNS. Sie runden sich ab und gewinnen so die Fähigkeit zu amöboider Fortbewegung und Phagozytose [111, Santambrogio et al., 2001] [62, Kalla et al., 2003]. Als Zellen des unspezifischen Immunsystems produzieren Microgliazellen Cytokine und cytotoxische Agentien wie Superoxid und NO [2, Aloisi, 2001]. Außerdem können sie Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse II exprimieren, die der Antigenpräsentation dienen [11, Barron, 1995] [12, Barron, 2003].

1.4 Die untersuchten Zellen

Die Zelllinie N11

Bei den N11-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die aus primären Microgliazellen von CD1-Maus-Embryos durch retrovirale Transfektion generiert wurde. Sie exprimiert alle beschriebenen Phänotypenmarker für Microglia, weist typische Microglia-Eigenschaften wie F_cR-vermittelte Phagozytose und Cytokinproduktion auf und wird deshalb als Microgliamodell verwendet [105, Righi et al., 1989].

Die Zelllinie wurde gewählt, weil sie ein etabliertes Modell für die Induktion der NO-Produktion in Microgliazellen ist [18, Betz Corradin et al., 1993].

Die Zelllinie C6-BU-1

Die Zelllinie C6-BU-1 ist eine 5-Brom-2'-desoxyuridin-resistente Mutante [3, Amano et al., 1974] der von Benda et al., 1968 [16] beschriebenen Rattengliomzelllinie C6. Bei niedrigen Passagennummern können die C6-Zellen sowohl den Phänotyp von Astrocyten als auch den von Oligodendrocyten annehmen, die höheren Passagen exprimieren ausschließlich den astroglialen Phänotyp [79, Mangoura et al., 1989]. In unseren Experimenten wurden nur späte Passagen verwendet.

Ein Astroglia-Modell wurde untersucht, weil Astrocyten eine zentrale, teilweise regulierende Rolle beim Stoffwechsel des ZNS spielen und somit auch für die NO-Produktion in anderen Zellen bedeutsam sein könnten [135, Wiesinger, 2001].

Astroglia-reiche Rattenglia-Primärkulturen

Es handelt sich hierbei um Mischkulturen aus Astrogliazellen, Microgliazellen, Oligodendrocyten und Ependymzellen, die aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten gewonnen werden. Der Astrogliaanteil beträgt mindestens 80% [44, Hamprecht, 1985] [130, Verleysdonk, 1994].

Primärkulturen wurden untersucht, um zu prüfen, ob die bei den Zelllinien beobachteten Effekte auch bei nicht transformierten Zellen auftreten. Allerdings zwingt bei diesen Kulturen der Nachteil der Heterogenität zu einer kritischen Diskussion des zellulären Ursprungs der Ergebnisse.

Subkultivierte Rattenastrogliazellen

Diese Zellen wurden durch Passagierung der astroglia-reichen Rattenglia-Primärkulturen gewonnen. Nach der Passagierung bestehen die Kulturen zu 100% aus Astrogliazellen, da alle Zellen den Astroglia-Marker GFAP („glial fibrillary acidic protein“) exprimieren [J. Hullmann, unveröffentlichte Ergebnisse]. Diese Zellen sind also genetisch unveränderte astrogliale Zellen. Sie können jedoch nicht zwanglos mit Astrocyten gleichgesetzt werden, da die Differenzierung der Zellen *in vivo* von zahlreichen Faktoren gesteuert wird, die *in vitro* nicht vorhanden sind.

1.5 Ziel der Arbeit

Der Einfluss verschiedener Medikamente und Cytokine auf die induzierte NO-Produktion und die Expression der iNOS in Gliazellen ist bereits ausführlich untersucht worden. Die NO-Produktion und die Produktspezifität der iNOS werden jedoch auch maßgeblich durch die Verfügbarkeit von Arginin, dem Substrat der NO-Synthasen, beeinflusst (siehe Kap. 1.2.2). Deshalb ist es wichtig, neben der Regulation der iNOS selbst die Regulation der Enzyme und Transporter, die die Argininversorgung der iNOS sicherstellen, zu untersuchen.

Es wurde früher bereits gezeigt, dass die ASS und vor allem der Arginintransport bei Induktion der iNOS durch Immunstimulantien ebenfalls hochreguliert werden. Speziell in Gliazellen ist dagegen weitgehend unbekannt, ob — und wenn ja in welcher Weise — Medikamente und Cytokine, die die Regulation der iNOS beeinflussen, auch in die Expression dieser akzessorischen Enzyme und Transporter eingreifen.

In der vorliegenden Arbeit sollte in ausgewählten glialen Modellsystemen der Effekt von Aspirin[®], TGF- β und advanced glycation endproducts (AGEs) auf die Expression von ASS, ASL und von Arginintransportern untersucht werden und mit dem Effekt dieser Substanzen auf die induzierte NO-Produktion und die Expression der iNOS verglichen werden. Aspirin[®] wurde gewählt, weil verschiedene epidemiologische Studien darauf hinweisen, dass Aspirin[®] einen protektiven Effekt hinsichtlich der Entstehung des Morbus Alzheimer hat [126, Stewart et al., 1997] [5, Anthony et al., 2000] [26, Broe et al., 2000], neurodegenerative Komplikationen aber auch verstärken kann [102, Quan et al., 2000]. Als Aspirin[®] wurde die Acetylsalicylsäure eingesetzt. Cytokinen der TGF- β -Familie werden wesentliche Rollen in der Entwicklung des ZNS und in der Homöostase und Pathologie des adulten Nervensystems zugeschrieben [20, Böttner et al., 2000] [84, McLennan und Koishi, 2002]. TGF- β ist ein physiologisch wichtiger Negativregulator der iNOS und es wird vermutet, dass TGF- β in vivo die Verteilung von iNOS und ASS zwischen den verschiedenen neuronalen Zellarten mitbestimmt [131, Vincent et al., 1997] [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998]. Es wurde TGF- β_1 aus Schweine-Blutplättchen verwendet. Bei den AGEs handelt es sich um gealterte Proteine, die durch nichtenzymatische Reaktion mit Glucose modifiziert wurden; sie stehen im Verdacht an der Pathogenese des Morbus Alzheimer beteiligt zu sein [87, Münch et al., 1997] [127, Takeda et al., 1998]

[137, Wong et al, 2001a]. Die in dieser Arbeit verwendeten AGEs wurden von Prof. E. Schleicher, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Methoden kamen zur Anwendung: Die NO-Produktion wurde durch die Messung der Nitritkonzentration im Kulturmedium quantifiziert; Enzyme wurden in Zellhomogenaten mittels Western Blot nachgewiesen; zur Untersuchung der RNA-Expression der Arginintransporter wurde die Methode der RT-PCR gewählt.

Kapitel 2

Ergebnisse

Alle Versuche folgen einem ähnlichen Schema, nämlich dass in einem Zellkulturmodell die NO-Produktion durch Zugabe von LPS und/oder IFN- γ in das Kulturmedium induziert werden sollte. Nachdem die Zellen über Nacht mit den Stimulantien inkubiert worden waren, wurde die produzierte NO-Menge quantifiziert. Als Maß für die NO-Produktion diente die Konzentration des Nitrits im Kulturmedium. Aspirin[®], TGF- β und AGEs wurden, soweit nicht anders vermerkt, gleichzeitig mit den Stimulantien (LPS/IFN- γ) dem Kulturmedium zugegeben. Um die Ergebnisse mit unbehandelten Zellen vergleichen zu können, wurden als Negativkontrolle bei jedem Experiment auch Zellen mit Kulturmedium ohne Zusätze inkubiert.

Soweit nicht anders vermerkt wurde LPS in der Konzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt und IFN- γ in der Konzentration 100 U/ml. Die Konzentrationen der anderen Substanzen sind bei der Beschreibung der jeweiligen Ergebnisse angegeben. In der Regel wurde Aspirin[®] in der Konzentration 10 mM eingesetzt und TGF- β in der Konzentration 1 ng/ml.

Zunächst wurden Experimente durchgeführt, die Aufschluss darüber bringen sollten, in welchen Konzentrationen die ausgewählten Substanzen die induzierte NO-Produktion beeinflussen. Für TGF- β wurde dies nicht geprüft, sondern es wurde die vermutlich wirksame Konzentration aus den Angaben des Herstellers (1 ng/ml) übernommen. Außerdem wurde untersucht, ob der Effekt von Aspirin[®] davon abhängt, ob es dem Medium gleichzeitig mit oder nach den Stimulantien (LPS/INF γ) zugegeben wurde.

Im Hauptteil der Arbeit wurde der Einfluss von Aspirin[®] und TGF- β auf die induzierte NO-Produktion und auf die Expression der für die NO-Produktion we-

sentlichen Enzyme iNOS, ASS und ASL untersucht. Die Quantifizierung der Enzyme erfolgte mittels Western Blot. Bei dem Microgliamodell N11-Zellen wurde außerdem mittels RT-PCR untersucht, ob sich die Zugabe von Aspirin[®] ins Medium auf die Transkription des ASS-, des CAT-1- und des CAT-2A-Gens auswirkt.

Um zu überprüfen, ob die Effekte von Aspirin[®] auf einer Zellschädigung beruhen, wurde als Cytotoxizitätstest die Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) ins Medium gemessen. Außerdem wurden die Zellen prinzipiell nach jedem Experiment unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet, um morphologische Auffälligkeiten zu erkennen.

Darstellung der Ergebnisse

Bei Mehrfachbestimmungen der Nitrit-Konzentration wurden mehrere Zellkulturschalen unter den gleichen Bedingungen inkubiert und es wurde der Mittelwert der Ergebnisse berechnet (meistens wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt). Die Gesamthöhe des Fehlerbalkens in der grafischen Darstellung entspricht der doppelten Standardabweichung. Bei Zweifachbestimmungen entspricht der Fehlerbalken dem Abstand der beiden Messwerte. Die Fehlerbalken wurden nicht eingezeichnet, wenn sie kleiner als die gezeichneten Messpunkte waren. Die Experimente mit Einfachbestimmung der Nitritkonzentration waren Stimulationsexperimente, die der Gewinnung von Homogenaten für RT-PCR/Western Blot dienten (hier wurde für jede Stimulationsbedingung nur eine große Plastikschale mit 9 cm Durchmesser verwendet). Aus Platzgründen und zur besseren Beschriftung der einzelnen Balken wurden die Histogramme bei den Experimenten mit AGEs waagrecht gezeichnet. Mit „Kontrolle“ wird jeweils die Bedingung mit „Medium ohne Zusätze“ bezeichnet.

2.1 Effekte von Aspirin[®]

2.1.1 Inhibition der NO-Synthese in N11-Zellen durch Aspirin[®]: Konzentrationsabhängigkeit

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass Aspirin[®] in verschiedenen glialen Zelllinien die durch LPS und/oder IFN- γ induzierte NO-Produktion hemmt. Es sollte zunächst geprüft werden, ob diese Inhibition der NO-Produktion von der Aspirinkonzentration abhängt. Dazu wurden N11-Zellen mit LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) und mit unterschiedlichen

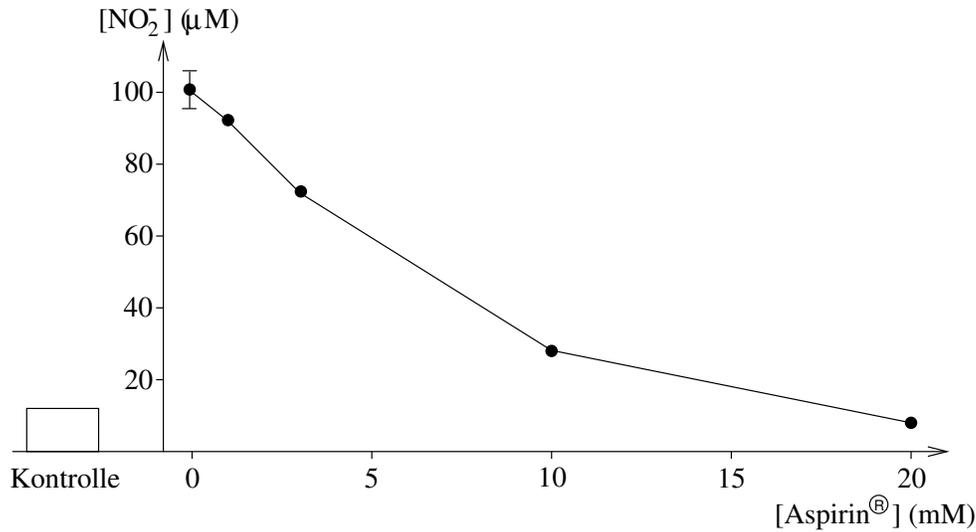


Abbildung 2.1: Inhibition der induzierten NO-Produktion in N11-Zellen durch unterschiedliche Konzentrationen von Aspirin®. N11-Zellen der Passage 20 wurden 20 h lang mit LPS und unterschiedlichen Konzentrationen von Aspirin® inkubiert, anschließend wurde die NO₂⁻-Konzentration im Kulturmedium bestimmt (3-fach-Bestimmung).

Konzentrationen an Aspirin® inkubiert. Nach 20 Stunden wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. In Abbildung 2.1 ist das Ergebnis eines der beiden Experimente dargestellt.

Bei einer Aspirin®konzentration von 1 und 3 mM war die Nitritkonzentration nur wenig reduziert, bei 10 mM ging sie um 75% zurück, bei 20 mM war die Nitritkonzentration vergleichbar mit der von Kontrollzellen. Für die weiteren Experimente wurde eine Aspirinkonzentration von 10 mM gewählt.

Effekt von Aspirin® allein: Zusätzlich wurde geprüft, ob Aspirin® allein einen Effekt auf die NO-Produktion hat. Dazu wurden N11-Zellen 20 Stunden lang mit Medium, das 3 mM oder 10 mM Aspirin® enthielt, inkubiert, anschließend wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium ohne Zusätze inkubiert. Auch bei den Zellen, die mit Medium ohne Zusätze inkubiert worden waren, wurde eine schwache Induktion der NO-Produktion gefunden, die Nitritkonzentration im Medium betrug hier 13 µM. Die Inkubation mit Aspirin® führte zu einer Reduktion der Nitritkonzentration. Bei einer Aspirinkonzentration von 3 mM betrug die Nitritkonzentration 8.5 µM, bei einer Konzentration

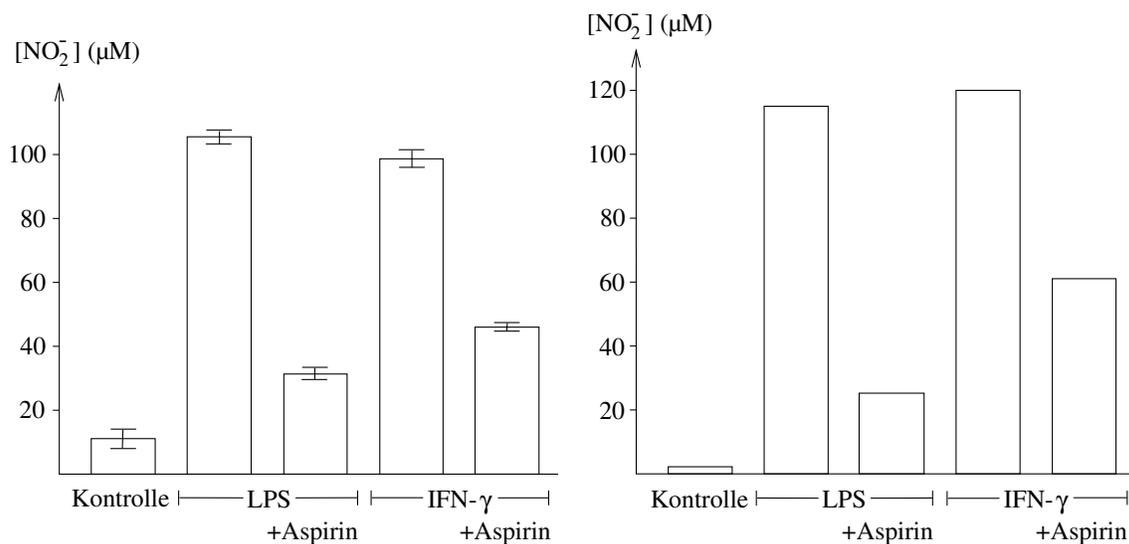


Abbildung 2.2: Einfluss von Immunstimulanzien und Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in N11-Zellen. N11-Zellen wurden 20 h lang mit LPS oder IFN- γ und zusätzlich mit oder ohne Aspirin[®] (10 mM) inkubiert. Danach wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (links: Passage-Nr. 11, 3-fach-Bestimmung; rechts: Passage-Nr. 67, 1-fach-Bestimmung).

von 10 mM betrug sie $7.8 \mu\text{M}$. (Daten nicht gezeigt).

2.1.2 N11-Zellen

Bei Untersuchungen anderer Autoren [67, Kepka-Lenhart et. al., 1996] [32, Chen et al., 1999] an Macrophagen-Zelllinien der Maus wurde gefunden, dass Acetylsalicylsäure in mit LPS stimulierten Zellen andere Effekte hat als in mit IFN- γ stimulierten Zellen. Es wurde gezeigt, dass bei Induktion der iNOS durch LPS die Expression der iNOS-mRNA durch Acetylsalicylsäure inhibiert wird. Wird die iNOS jedoch mit IFN- γ induziert, bewirkt Acetylsalicylsäure eine Steigerung der Expression der iNOS-mRNA, während die NO-Produktion in beiden Fällen inhibiert wurde. Aus diesem Grund wurden die N11-Zellen sowohl mit LPS als auch mit IFN- γ stimuliert.

Nitritbestimmung

Der Einfluss von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in dem Microgliamodell N11-Zellen wurde in insgesamt neun Stimulationsexperimenten untersucht. Abbildung 2.2 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von zwei Experimenten. Nach Induktion der NO-Produktion mit LPS oder IFN- γ und Inkubation über Nacht wurden im

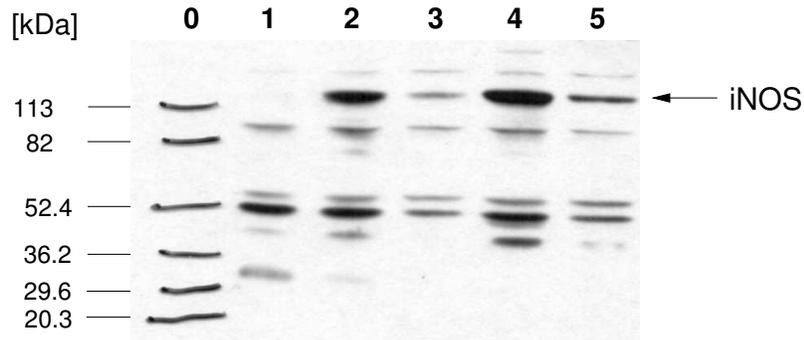


Abbildung 2.3: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression der iNOS in N11-Zellen. N11-Zellen der Passage 13 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS (Spur 2), Medium+LPS+Aspirin[®] (Spur 3), Medium+IFN- γ (Spur 4), Medium+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 5). Spur 0: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 2“ (siehe Kap. 4.6.3).

Kulturmedium Nitritkonzentrationen von durchschnittlich 98 μ M gemessen. Die Behandlung der Zellen mit Aspirin[®] führte sowohl in den mit LPS stimulierten Zellen als auch in den mit IFN- γ stimulierten Zellen zu einer starken Reduktion der Nitritkonzentration. Bei den mit LPS stimulierten Zellen war die Nitritkonzentration in den mit Aspirin[®] behandelten Ansätzen um durchschnittlich 76% (68%–82%) niedriger als in den nur mit LPS behandelten Ansätzen. Bei den mit IFN- γ -stimulierten Zellen fiel dieser Effekt etwas geringer aus, er betrug hier durchschnittlich nur 67% (48%–91%).

Western Blot zur Untersuchung der iNOS-Expression

Um zu untersuchen, ob Aspirin[®] die Expression der iNOS in N11-Zellen hemmt, wurde das iNOS-Protein in Zellhomogenaten mittels Western Blot nachgewiesen. Die Proteine wurden durch Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, anschließend wurde mit iNOS-spezifischem Antiserum inkubiert. Aufgrund seiner Molekülmasse von 135 kDa wird das iNOS-Protein etwas oberhalb der Markerbande bei 113 kDa sichtbar. Der Western Blot wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt, das Ergebnis eines der beiden Experimente zeigt Abbildung 2.3.

Während bei unbehandelten Zellen kein iNOS-Protein detektierbar war (Spur 1), führte die Inkubation mit LPS oder IFN- γ zur Expression der iNOS (Spuren 2+4). Die Behandlung mit Aspirin[®] führte sowohl bei Stimulation durch LPS als auch bei Stimulation durch IFN- γ zu einer starken Reduktion der nachweisbaren Prote-

inmenge (Spuren 3+5).

In Abbildung 2.3 ist der gesamte Western-Blot gezeigt. Es fällt auf, dass mehrere, nicht iNOS-spezifische Banden sichtbar sind. Die Intensität einiger dieser Banden wurde durch die Behandlung der Zellen mit LPS, IFN- γ oder Aspirin[®] entweder verstärkt oder abgeschwächt. Bei anderen Banden war die Intensität unabhängig von der Behandlung der Zellen bei allen Homogenaten gleich. Es könnte sich bei diesen unspezifischen Banden um Abbauprodukte der iNOS handeln, oder um Produkte einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit ähnlichen Proteinen.

Western Blot zur Untersuchung der ASS- und der ASL-Expression

Es sollte untersucht werden, ob die Expression der beiden Enzyme ASS und ASL durch Aspirin[®] in gleicher Weise beeinflusst wird wie die Expression der iNOS. Dazu wurden die Zellen homogenisiert und ASS und ASL mittels Western Blot nachgewiesen. Aufgrund seiner Molekülmasse von 47 kDa wird das ASS-Protein in etwa auf Höhe der Markerbande bei 52.4 kDa sichtbar, das 52 kDa schwere ASL-Protein knapp darüber. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. Die beiden Western Blots sind in Abbildung 2.4 und 2.5 gezeigt.

N11-Zellen wurden mit LPS, IFN- γ und Aspirin[®] inkubiert. ASS-Protein war in keinem der Homogenate nachweisbar. ASL-Protein war dagegen, unabhängig von der Behandlung der Zellen, in allen Homogenaten vorhanden. Die Menge an ASL-Protein variierte leicht von Homogenat zu Homogenat, eine reproduzierbare Beeinflussung der ASL-Expression durch die untersuchten Substanzen war aber nicht zu erkennen. Als Positivkontrolle für die ASS dienten Homogenate von C6-BU-1-Zellen, bei denen eine deutliche Bande zu sehen war.

Untersuchung der Transkription des ASS-, CAT-1- und CAT-2A-Gens mit Hilfe der RT-PCR

Bisher wurde in Gliazellen nicht untersucht, ob akzessorische Proteine der NO-Produktion durch Immunstimulantien oder Aspirin[®] auf Transkriptionsebene beeinflusst werden. Zu den akzessorischen Proteinen zählen u.a. die ASS und die Aminosäuretransporter CAT-1 und CAT-2, mit deren Hilfe Zellen das NOS-Substrat Arginin aus dem Extrazellulärraum aufnehmen können. Mit Hilfe der RT-PCR sollte die mRNA der betreffenden Proteine in N11-Zellen nachgewiesen werden. Die mRNA

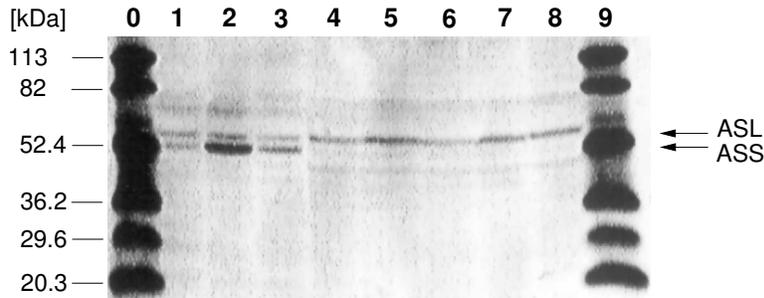


Abbildung 2.4: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression von ASS und ASL in N11-Zellen. Zellen der Passage 20 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 4), Medium+LPS (Spur 5), Medium+LPS+Aspirin[®] (Spur 6), Medium+IFN- γ (Spur 7), Medium+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 8). In den Spuren 1–3 wurden Homogenate von C6-BU-1-Zellen aufgetragen, diese Spuren können hier als Positivkontrolle für die ASS dienen: Spur 1: Medium allein, Spur 2: Medium+LPS+IFN- γ , Spur 3: Medium+LPS+IFN- γ +Aspirin[®]. Spuren 0+9: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

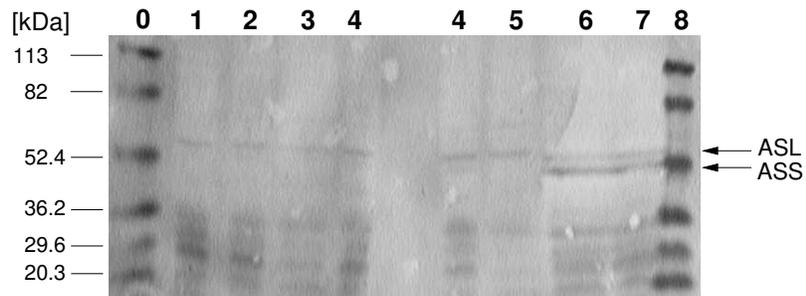


Abbildung 2.5: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression von ASS und ASL in N11-Zellen. Zellen der Passage 15 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS (Spur 2), Medium+LPS+Aspirin[®] (Spur 3), Medium+IFN- γ (Spur 4), Medium+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 5). In den Spuren 6 und 7 wurden Homogenate von C6-BU-1-Zellen aufgetragen, die mit LPS+IFN- γ +TGF- β inkubiert worden waren, sie können hier als Positivkontrolle für die ASS dienen. Spuren 0+8: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

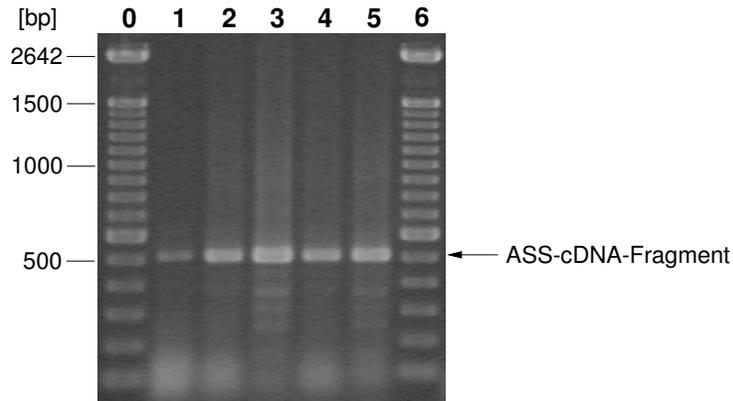


Abbildung 2.6: Einfluß von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression der ASS-mRNA in N11-Zellen. Zellen der Passage 29 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS (Spur 2), Medium+LPS+Aspirin[®] (Spur 3), Medium+IFN- γ (Spur 4), Medium+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 5). Spuren 0+6: DNA-Molekulargewicht-Marker.

wurde aus Zellhomogenaten isoliert. Anschließend wurden eine Reverse Transkription und eine PCR mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt.

ASS: Das Ergebnis der RT-PCR zum Nachweis der ASS-mRNA zeigt Abb. 2.6. In unbehandelten Zellen war nur wenig ASS-mRNA nachweisbar (Spur 1). In mit LPS oder IFN- γ stimulierten Zellen war die Expression der ASS-mRNA verstärkt (Spuren 2+4). Durch die Behandlung mit Aspirin[®] wurde die Expression der ASS-mRNA sowohl bei Stimulation mit LPS als auch bei Stimulation mit IFN- γ nochmals etwas verstärkt (Spuren 3+5).

CAT-1 und CAT-2A: Die Familie der Transporter für kationische Aminosäuren (CATs), auch System γ^+ genannt, vermittelt den Transport der positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin durch die Plasmamembran. Die Expression dieser Transporter ist somit relevant für die Versorgung der NOS mit ihrem Substrat Arginin. In Transportstudien mit neuronalen Zellen wurde bereits gezeigt, dass der Transport von Arginin unter proinflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird (siehe 1.2.2). Mit der Technik der RT-PCR sollte nun diese Regulation für die beiden Transporter CAT-1 und CAT-2A auf Ebene der Transkription untersucht werden. Das Ergebnis der RT-PCR zum Nachweis der CAT-1- und CAT-2A-mRNA zeigt Abb. 2.7.

CAT-1-mRNA war auch in unbehandelten N11-Zellen exprimiert (Spur 1), die

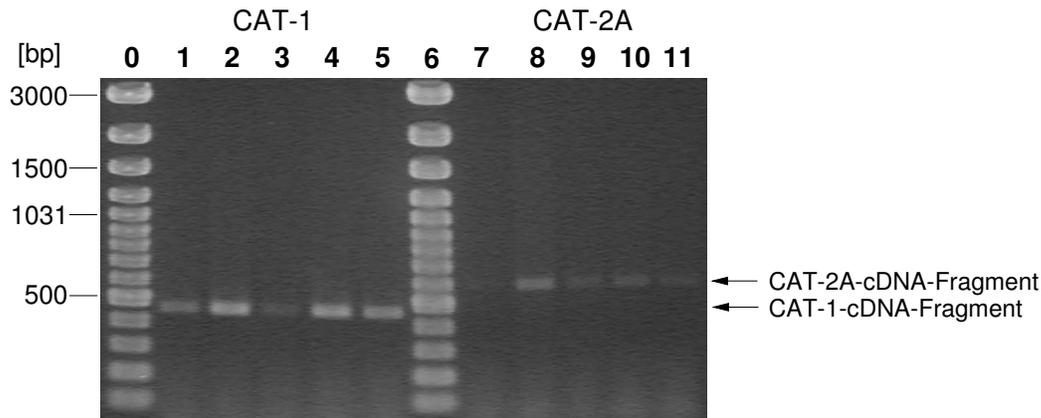


Abbildung 2.7: Einfluß von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression der CAT-1- und CAT-2A-mRNA in N11-Zellen. Zellen der Passage 29 wurden behandelt mit: Medium allein (Spur 1+7), Medium+LPS (Spur 2+8), Medium+LPS+Aspirin[®] (Spur 3+9), Medium+IFN- γ (Spur 4+10), Medium+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 5+11). Spuren 0+6: DNA-Molekulargewicht-Marker.

Behandlung mit LPS oder IFN- γ verstärkte die Expression (Spuren 2+4). Durch die Behandlung mit Aspirin[®] wurde die Expression der CAT-1-mRNA bei mit LPS stimulierten Zellen stark vermindert (Spur 3). Auch bei den IFN- γ -stimulierten Zellen führte die Behandlung mit Aspirin[®] zu einer Reduktion der Expression, die jedoch nicht so stark ausfiel (Spur 5).

CAT-2A-mRNA wurde im Gegensatz zur CAT-1-mRNA in unbehandelten N11-Zellen nicht exprimiert (Spur 7). Durch Behandlung mit LPS wurde die Expression induziert (Spur 8). Auch die Behandlung mit IFN- γ induzierte die Expression, jedoch weniger stark (Spur 10). Die Behandlung mit Aspirin[®] führte sowohl bei Stimulation mit LPS als auch bei Stimulation mit IFN- γ zu einer Reduktion der Expression der CAT-2A-mRNA (Spuren 9+11).

2.1.3 C6-BU-1-Zellen

Es wurde untersucht, ob die bei dem Microgliamodell N11-Zellen beobachteten Effekte von Aspirin[®] auch bei dem Astrocytenmodell C6-BU-1 auftreten.

In C6-BU-1-Zellen lässt sich die NO-Produktion nicht mit LPS oder IFN- γ allein induzieren, sondern nur mit einer Kombination beider Substanzen [116, Schmidlin et al., 1997]. Die Zellen wurden deshalb mit LPS und IFN- γ gemeinsam stimuliert. Auch die Kombination von LPS und IFN- γ führte nicht immer zu einer Induktion der NO-Produktion, diese Experimente wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

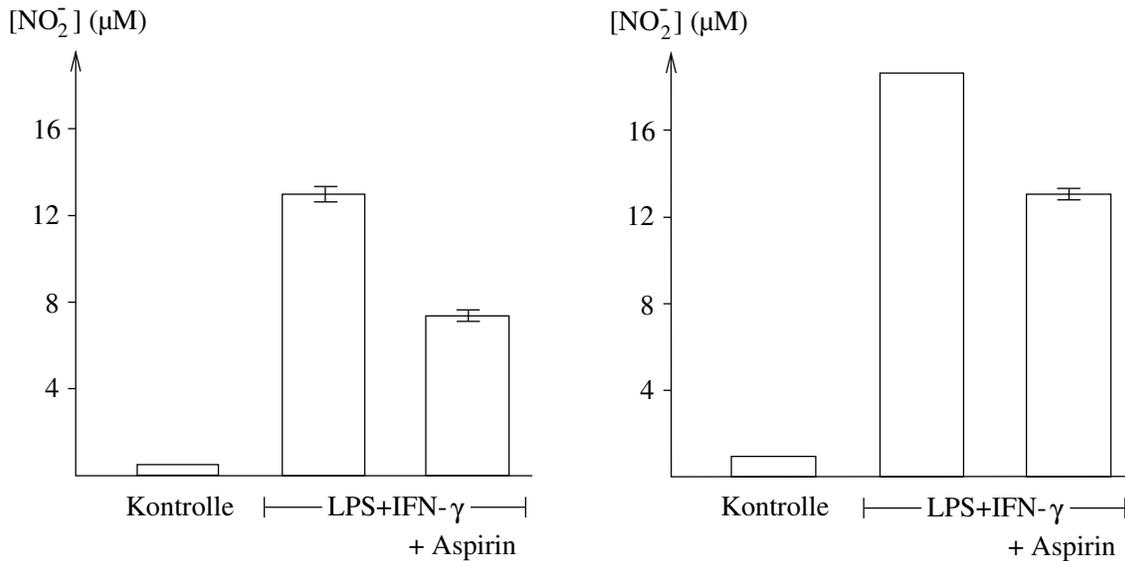


Abbildung 2.8: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die NO-Produktion in C6-BU-1-Zellen. Die Zellen wurden 20 h lang mit LPS und IFN- γ und zusätzlich mit oder ohne Aspirin[®] (10 mM) inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (links: Passage-Nr. 26, rechts: Passage-Nr. 27; jeweils 3-fach-Bestimmung).

Nitritbestimmung

Es wurden insgesamt acht Experimente zur Untersuchung der Auswirkungen von Aspirin[®] auf die NO-Produktion in C6-BU-1-Zellen durchgeführt. Abbildung 2.8 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von zwei Experimenten.

Die Nitritkonzentrationen betragen nach Induktion der NO-Produktion mit LPS und IFN- γ und 20 Stunden langer Inkubation durchschnittlich 15 μ M. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit Aspirin[®] führte zu einer deutlichen Reduktion der Nitritkonzentration. Nur bei einem Experiment war die Nitritkonzentration bei den mit Aspirin[®] behandelten Zellen geringfügig höher als bei den Zellen, die mit LPS und IFN- γ allein behandelten wurden. Durchschnittlich war die Nitritkonzentration bei den mit Aspirin[®] behandelten Zellen um 35% (+9% bis -75%) reduziert.

Western Blot zur Untersuchung der iNOS-Expression

Zum Nachweis des iNOS-Proteins wurden die Zellen zunächst homogenisiert, die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurde mit iNOS-spezifischem Antiserum inkubiert. Aufgrund seiner Molekülmasse von 135 kDa wird das iNOS-Protein etwas oberhalb der

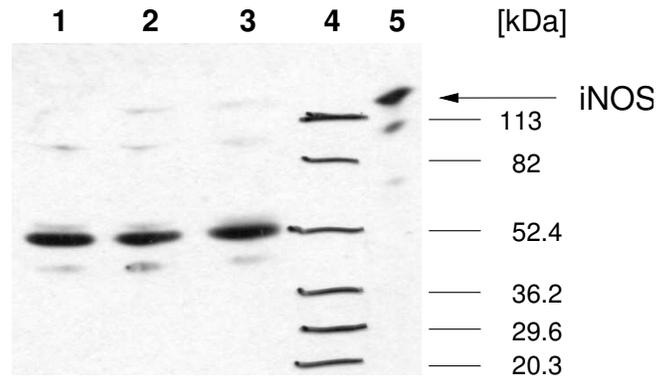


Abbildung 2.9: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression der iNOS in C6-BU-1-Zellen. Zellen der Passage 31 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS+IFN- γ (Spur 2), Medium+LPS+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 3). Spur 4: Markerproteine, Spur 5: Positivkontrolle = Macrophagenlysat. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 2“ (siehe Kap. 4.6.3).

Markerbande bei 113 kDa sichtbar (siehe Bande der Positivkontrolle). Das Ergebnis des Western Blots zum Nachweis der iNOS ist in Abbildung 2.9 gezeigt.

Insgesamt war in C6-BU-1-Zellen nur sehr wenig iNOS-Protein nachweisbar, es ist deshalb schwierig, Aussagen über den Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Expressionsniveau zu machen. Mit einiger Vorsicht kann jedoch gesagt werden, dass in unbehandelten C6-BU-1-Zellen lediglich Spuren des iNOS-Proteins nachweisbar waren (Spur 1), während in mit LPS und IFN- γ behandelten Zellen die iNOS-Expression etwas verstärkt war (Spur 2). Die Behandlung der Zellen mit Aspirin[®] führte zu keiner erkennbaren Änderung der iNOS-Expression (Spur 3).

Wie in Abbildung 2.9 zu sehen ist, sind mehrere nicht iNOS-spezifische Banden vorhanden (Vergleiche hierzu die Erklärung zum iNOS-Nachweis bei N11-Zellen auf Seite 24).

Western Blot zur Untersuchung der ASS- und ASL-Expression

Um den Einfluss von Aspirin[®] auf die Expression der Enzyme ASS und ASL zu untersuchen, wurden das ASS- und das ASL-Protein in homogenisierten Zellen mittels Western Blot nachgewiesen. Das 47 kDa schwere ASS-Protein wird in etwa auf Höhe der Markerbande bei 52.4 kDa sichtbar, das ASL-Protein mit einem Molekulargewicht von 52 kDa knapp darüber. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. Das Ergebnis eines Western Blots zeigt Abbildung 2.10.

In unbehandelten C6-BU-1-Zellen waren nur geringe Mengen ASS-Protein nach-

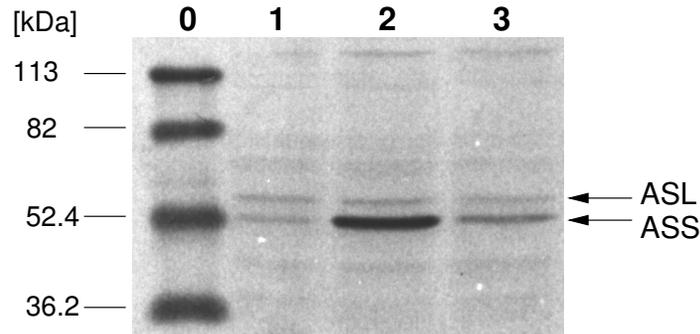


Abbildung 2.10: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression der ASS und der ASL in C6-BU-1-Zellen. Zellen der Passage 32 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS+IFN- γ (Spur 2), Medium+LPS+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 3). Spur 0: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

weisbar (Spur 1), erst nach Stimulation der Zellen mit LPS und IFN- γ stieg die Menge an ASS-Protein stark an (Spur 2). Die Behandlung der Zellen mit Aspirin[®] führte zu einer erheblichen Reduktion der ASS-Expression (Spur 3).

Die Expression der ASL wurde durch keine der untersuchten Substanzen beeinflusst, sie war unter allen Bedingungen gleich (Spuren 1–3).

2.1.4 Astroglia-Sekundärkulturen

Um die Ergebnisse der Experimente mit Zelllinien mit Experimenten an genetisch unveränderten Zellen vergleichen zu können, wurden reine Astrogliakulturen der Ratte verwendet, die durch Passagierung (Subkultivierung) von primären Gliamischkulturen gewonnen worden waren.

Nitritbestimmung

In subkultivierten Rattenastrogliazellen war die NO-Produktion nach der zweiten Passagierung nur noch gering bis überhaupt nicht induzierbar. Der Einfluss von Aspirin[®] auf die NO-Produktion konnte deshalb nicht untersucht werden.

Es wurden drei Experimente zur Untersuchung der Induzierbarkeit der NO-Produktion durchgeführt. Nach der ersten Passagierung der Zellen wurde durch Inkubation mit LPS und IFN- γ über Nacht eine Nitritkonzentration im Medium von 13.5 μ M beim ersten Experiment und 6.5 μ M beim zweiten Experiment erreicht. Nach der zweiten Passagierung ließ sich praktisch keine NO-Produktion mehr induzieren, die Nitritkonzentration lag dann sowohl bei den stimulierten Zellen als auch

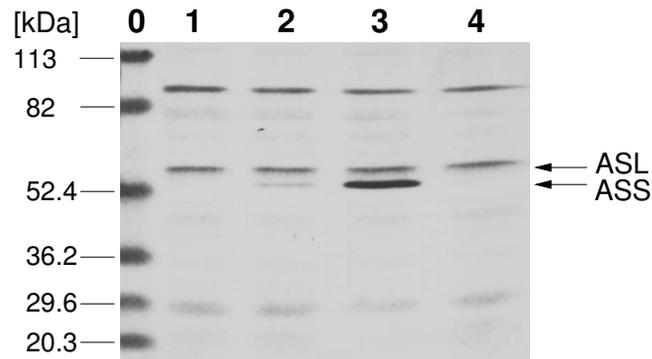


Abbildung 2.11: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die Expression von ASS und ASL in Rattenastrocyten. Zellen der Passage 2 wurden behandelt mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS+IFN- γ (Spur 2), Medium+LPS+IFN- γ +TGF- β (Spur 3), diese Spur kann hier als Positivkontrolle dienen (siehe 2.2.3), Medium+LPS+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 4). Spur 0: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

bei den Kontrollzellen zwischen 2 und 2.5 μ M. (Daten nicht gezeigt).

Western Blot zur Untersuchung der ASS- und ASL-Expression

Es sollte der Einfluss von Immunstimulationen und Aspirin[®] auf die Expression von ASS und ASL untersucht werden. Dazu wurden das ASS- und das ASL-Protein in Zellhomogenaten mittels Western Blot nachgewiesen. Das Ergebnis des Western Blots zeigt Abbildung 2.11.

In unstimulierten Rattenastrocyten war kein ASS-Protein nachweisbar (Spur 1). Nach Behandlung der Zellen mit LPS und IFN- γ war die ASS gering exprimiert (Spur 2), bei zusätzlicher Behandlung mit Aspirin[®] lag die Menge an ASS-Protein nur noch knapp über der Nachweisgrenze (Spur 4). ASL-Protein war in allen untersuchten Proben nachweisbar, die Expression wurde durch die Zugabe von Immunstimulantien oder Aspirin[®] nicht beeinflusst.

2.1.5 Astrogliareiche Primärkulturen

In mehreren Experimenten wurde der Einfluss von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in astrogliareichen Gliamischkulturen der Ratte untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Ergebnisse nur bedingt reproduzierbar waren. Sowohl die Induzierbarkeit der NO-Produktion durch LPS oder IFN- γ als auch der Einfluss von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion waren von Experiment zu Experiment verschieden.

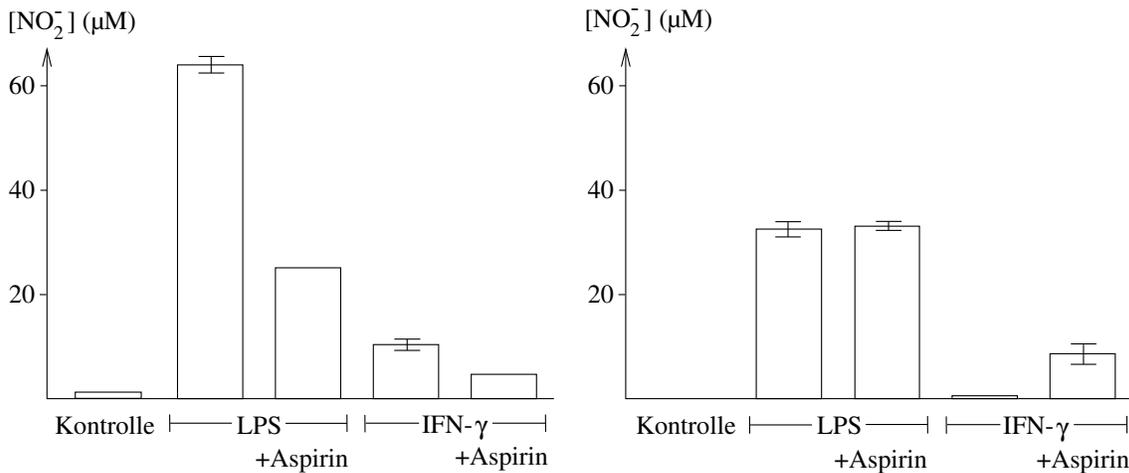


Abbildung 2.12: Einfluss von Immunstimulantien und Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in astrogliareichen Rattenglia-Primärkulturen. Die Zellen wurden 20 h lang mit LPS oder IFN- γ und zusätzlich mit oder ohne Aspirin[®] (10 mM) inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (links: 3-fach-Bestimmung, rechts: 2-fach-Bestimmung).

Nitritbestimmung

Der Effekt von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion wurde in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.12 dargestellt. Zur Induktion der NO-Produktion wurden die Zellen 20 Stunden lang mit LPS oder IFN- γ inkubiert. Bei einem Experiment führte die Inkubation mit IFN- γ jedoch nicht zur Induktion der NO-Produktion. Bei zusätzlicher Inkubation mit Aspirin[®] war die Nitritkonzentration bei einem Experiment reduziert. Bei dem anderen Experiment war die Nitritkonzentration bei Inkubation mit Aspirin[®] unverändert, wenn die Stimulation mit LPS erfolgte, und erhöht bei Stimulation mit IFN- γ .

2.2 Effekte von TGF- β

Nachdem mit Aspirin[®] ein künstlich synthetisiertes Pharmakon untersucht worden war, sollte zusätzlich der Einfluss einer körpereigenen Substanz auf die NO-Produktion und die Expression der Enzyme iNOS, ASS und ASL untersucht werden. TGF- β wurde gewählt, weil vermutet wird, dass es eine Rolle bei der Regulation der Expression der iNOS im ZNS spielt. Beispielsweise wurde in Zellkulturexperimenten gezeigt, dass TGF- β den hemmenden Einfluss von Astrocyten auf die Expression

der iNOS in Microgliazellen vermittelt [131, Vincent et al., 1997]. Ebenso könnte TGF- β bei der Regulation des Verteilungsmusters der ASS in den verschiedenen glialen Zellarten eine Rolle spielen. So wird die ASS in vitro vor allem in Astrocyten exprimiert, während sie in vivo in erster Linie ein microgliales Enzym ist [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998] [50, Heneka et al., 1999]. Die Experimente zur Untersuchung der Effekte von TGF- β wurden in Analogie zu den Experimenten zur Untersuchung des Effekts von Aspirin[®] durchgeführt.

2.2.1 N11-Zellen

Nitritbestimmung

Mit N11-Zellen wurden sechs Experimente zur Untersuchung des Effekts von TGF- β auf die induzierte NO-Produktion durchgeführt. Um die NO-Produktion zu induzieren, wurden die Zellen 20 Stunden lang mit LPS oder IFN- γ inkubiert, in einem Experiment auch mit beiden Stimulantien gleichzeitig. Gleichzeitig mit LPS oder/und IFN- γ wurde dem Medium bei einem Teil der Kulturschalen zusätzlich TGF- β zugegeben. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. In Abbildung 2.13 sind die Ergebnisse von zwei typischen Experimenten dargestellt.

TGF- β hatte bei keinem der Experimente mit N11-Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Nitritkonzentration im Kulturmedium. Es war allenfalls eine Tendenz in Richtung Reduktion der Nitritkonzentration durch TGF- β erkennbar.

Western Blot zur Untersuchung der ASS- und ASL-Expression

Es sollte untersucht werden, ob TGF- β die Expression der Enzyme ASS und ASL in N11-Zellen beeinflusst. Dazu wurden die Zellen nach der Stimulation homogenisiert, die Proteine wurden durch Elektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurde mit ASS-spezifischem und ASL-spezifischem Antiserum gemeinsam inkubiert. Das ASS-Protein hat eine Molekülmasse von 47 kDa und wird daher in etwa auf Höhe der Markerbande bei 52.4 kDa sichtbar, das ASL-Protein mit 52 kDa knapp darüber. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung 2.14 dargestellt.

ASS-Protein war bei N11-Zellen nur in Spuren nachweisbar, die Behandlung der Zellen mit LPS, IFN- γ oder TGF- β beeinflusste die Expression nicht. ASL-Protein war in allen untersuchten Proben nachweisbar, die ASL-Expression wurde durch die

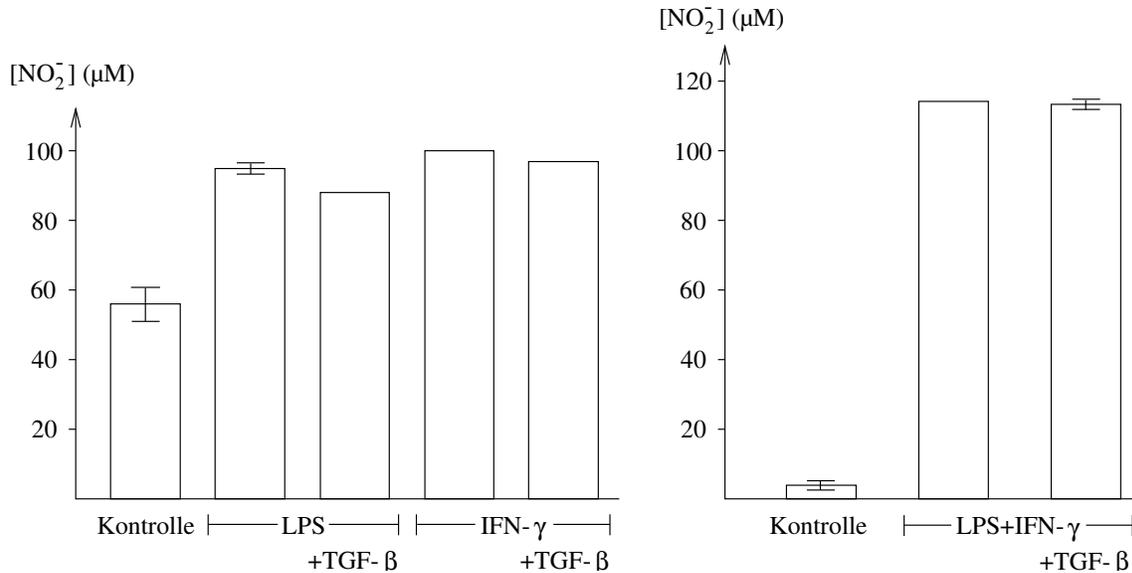


Abbildung 2.13: Einfluss von Immunstimulantien und TGF-β auf die induzierte NO-Produktion in N11-Zellen. Die Zellen wurden 20 h lang mit LPS oder/und IFN-γ und zusätzlich mit oder ohne TGF-β (1 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (links: N11-Zellen der Passage 15, 3-fach-Bestimmung; rechts: N11-Zellen der Passage x+3, 2-fach-Bestimmung).

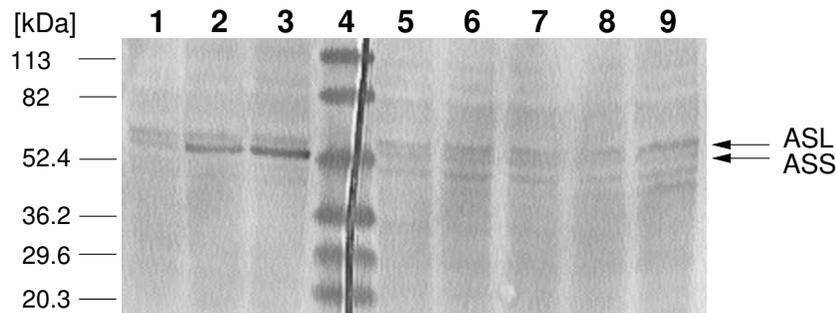


Abbildung 2.14: Einfluss von Immunstimulantien und TGF-β auf die Expression der ASS und der ASL in N11-Zellen. N11-Zellen der Passage 16 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 5), Medium+LPS (Spur 6), Medium+LPS+TGF-β (Spur 7), Medium+IFN-γ (Spur 8), Medium+IFN-γ+TGF-β (Spur 9). In den Spuren 1–3 wurden Homogenate von C6-BU-1-Zellen aufgetragen, diese Spuren können hier als Positivkontrolle für die ASS dienen: Spur 1: Medium allein, Spur 2: Medium+LPS+IFN-γ, Spur 3: Medium+LPS+IFN-γ+TGF-β. Spur 4: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

Zugabe von Immunstimulantien oder TGF- β nicht beeinflusst.

2.2.2 C6-BU-1-Zellen

Nitritbestimmung

Es wurden insgesamt sieben Stimulationsexperimente zur Untersuchung des Effekts von TGF- β auf die induzierte NO-Produktion in C6-BU-1-Zellen durchgeführt. Die Nitritkonzentrationen, die nach Induktion der NO-Produktion mit LPS und IFN- γ gemessen wurden, variierten stark von Experiment zu Experiment (6.5 μM –80.5 μM), die durchschnittliche Konzentration lag bei 27 μM . In Abbildung 2.15 sind exemplarisch die Ergebnisse von zwei Experimenten dargestellt.

Die Behandlung der Zellen mit TGF- β führte zu einer Reduktion der Nitritkonzentration im Kulturmedium. Bei den mit TGF- β behandelten Zellen war die Nitritkonzentration um durchschnittlich 53% (39%–64%) niedriger als bei den nur mit LPS und IFN- γ behandelten Zellen.

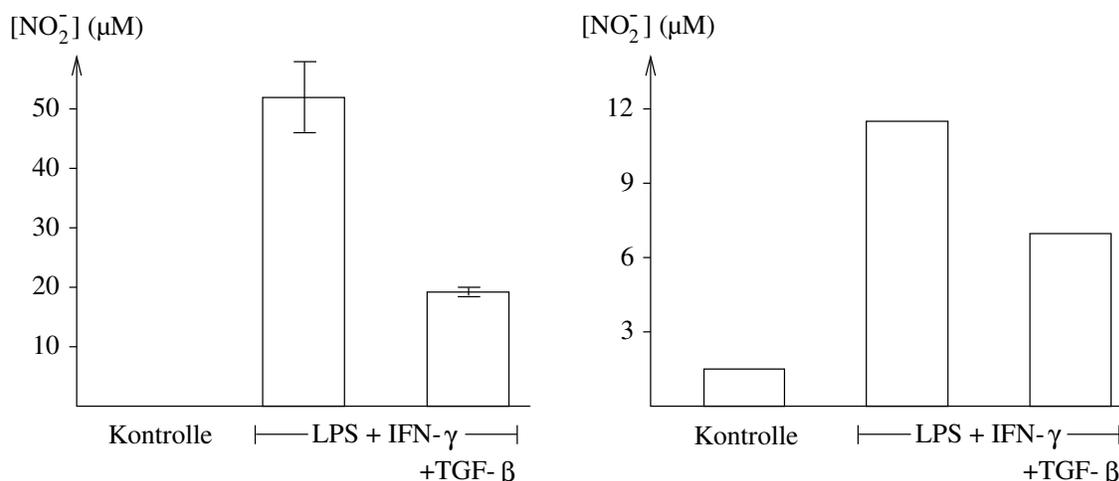


Abbildung 2.15: Einfluss von Immunstimulantien und TGF- β auf die induzierte NO-Produktion in C6-BU-1-Zellen. C6-BU-1-Zellen wurden mit LPS und IFN- γ und zusätzlich mit oder ohne TGF- β 20 h lang inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (links: Zellen der Passage 33, 3-fach-Bestimmung; rechts: Zellen der Passage 36, 1-fach-Bestimmung).

Western Blot zur Untersuchung der ASS- und ASL-Expression

Um den Einfluss von Immunstimulantien und TGF- β auf die Expression von ASS und ASL in C6-BU-1-Zellen zu untersuchen, wurden das ASS- und das ASL-Protein

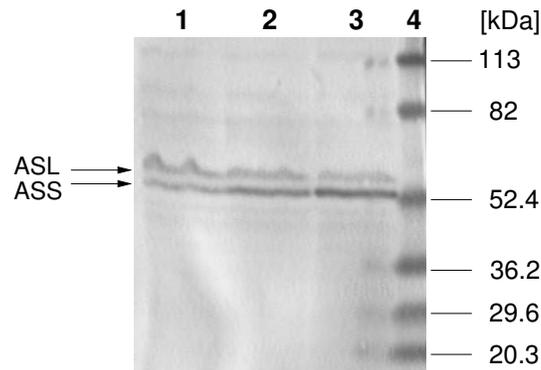


Abbildung 2.16: Einfluss von Immunstimulantien und TGF- β auf die ASS-Expression in C6-BU-1-Zellen. C6-BU-1-Zellen der Passage 37 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS+IFN- γ (Spur 2), Medium+LPS+IFN- γ +TGF- β (Spur 3). Spur 4: Markerproteine Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

in Zellhomogenaten nachgewiesen. Das Experiment wurde vier mal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. Das Ergebnis eines Western Blots zeigt Abbildung 2.16.

In unbehandelten C6-BU-1-Zellen war wenig ASS-Protein nachweisbar. Nach Inkubation der Zellen mit LPS und IFN- γ war die Expression der ASS verstärkt. Wurden die Zellen zusätzlich mit TGF- β inkubiert, war die Expression der ASS nochmals deutlich stärker. ASL-Protein war in allen Proben nachweisbar, die Expression wurde durch die Zugabe von Immunstimulantien oder TGF- β nicht beeinflusst. (Ein ähnliches Ergebnis zeigen die Spuren 1–3 der Abbildung 2.14).

2.2.3 Astroglia-Sekundärkulturen

In reinen subkultivierten Astrogliazellen konnte die NO-Produktion nicht wesentlich induziert werden, der Einfluss von TGF- β auf die induzierte NO-Produktion wurde deshalb bei diesen Zellen nicht untersucht. (Zu den Ergebnissen der Nitritbestimmung siehe Kap. 2.1.4).

Western Blot zur Untersuchung der ASS- und ASL-Expression

Mit der Technik des Western Blots wurde in Zellhomogenaten die Expression des ASS- und des ASL-Proteins untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.17 (=Western Blot der Abbildung 2.11) gezeigt.

In unbehandelten Astrocyten waren lediglich Spuren von ASS-Protein nachweisbar. Nach Inkubation mit LPS und IFN- γ war die ASS-Expression verstärkt. Bei

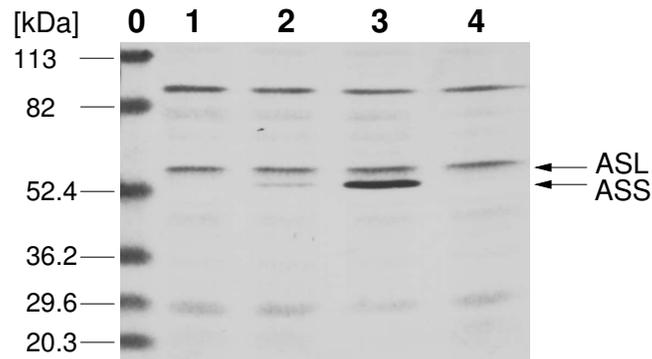


Abbildung 2.17: Einfluss von Immunstimulantien und TGF- β auf die ASS-Expression in Rattenaastrocyten. Zellen der Passage 2 wurden inkubiert mit: Medium allein (Spur 1), Medium+LPS+IFN- γ (Spur 2), Medium+LPS+IFN- γ +TGF- β (Spur 3), Medium+LPS+IFN- γ +Aspirin[®] (Spur 4). Spur 0: Markerproteine. Die Probengewinnung erfolgte nach „Protokoll 1“ (siehe Kap. 4.6.2).

zusätzlicher Inkubation der Zellen mit TGF- β war die Expression der ASS nochmals um ein Vielfaches stärker. Die ASL war in allen Homogenaten nachweisbar, ihre Expression wurde durch die Zugabe von Immunstimulantien oder TGF- β nicht beeinflusst.

2.2.4 Astrogliareiche Primärkulturen

In fünf Experimenten wurde der Effekt von TGF- β auf die induzierte NO-Produktion in astrogliareichen Rattengliaprimärkulturen untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch nur bedingt reproduzierbar (vergleiche Kap. 2.1.5). Die Ergebnisse von zwei Experimenten sind in Abbildung 2.18 dargestellt.

Um die NO-Produktion zu induzieren, wurden die Zellen 20 Stunden lang mit LPS, IFN- γ oder mit einer Kombination beider Substanzen inkubiert. Die zusätzliche Inkubation mit TGF- β führte bei drei Experimenten zu einer Reduktion der Nitritkonzentration im Medium, bei einem Experiment zu einer Steigerung der Nitritkonzentration und bei einem Experiment hatte TGF- β überhaupt keinen Effekt auf die Nitritkonzentration.

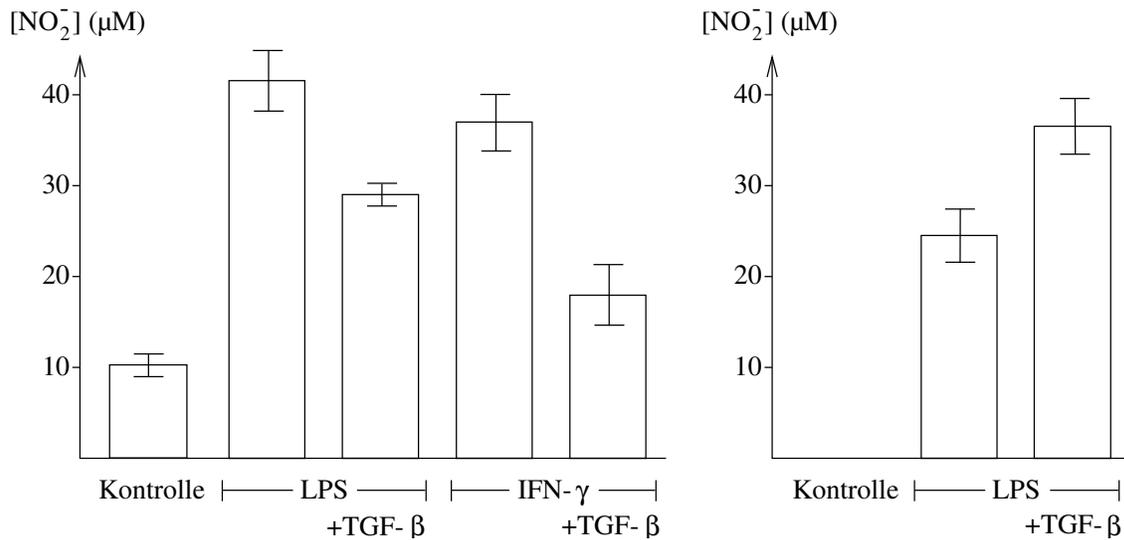


Abbildung 2.18: Einfluss von TGF- β auf die induzierte NO-Produktion in astrogliareichen Rattenglia-Primärkulturen. Die Zellen wurden 20 h lang mit LPS oder IFN- γ und zusätzlich mit oder ohne TGF- β inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen (links: 2-fach-Bestimmung, rechts: 3-fach-Bestimmung).

2.3 Experimente zur Klärung der Frage auf welcher Stufe des Induktionswegs Aspirin[®] die induzierte NO-Produktion hemmt.

In der Literatur ist die Möglichkeit beschrieben, dass Aspirin als Radikalfänger direkt mit NO reagiert [8, Asanuma et al., 2001]. Somit könnte die Reduktion der Nitritkonzentration im Medium stimulierter Zellen in Gegenwart von Aspirin[®] auf einem direkten Wegfangen des produzierten NO beruhen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind.

In einem ersten Experiment wurden N11-Zellen wiederum mit LPS inkubiert. Ein Teil dieser Kulturen wurde zusätzlich in Gegenwart von Aspirin[®] inkubiert, zu einem weiteren Teil wurde Aspirin[®] erst nach sieben Stunden aus einer sterilen Stammlösung zugegeben. Nach sieben Stunden sollte die Induktion der iNOS im wesentlichen abgeschlossen sein und das exprimierte Enzym sollte NO unabhängig von Immunstimulantien im Medium produzieren [114, Schmidlin und Wiesinger, 1995]. Nach 24 Stunden wurde die Nitritkonzentration aller Kulturüberstände gemessen. Wie man aus Abbildung 2.19 ersieht, betrug in diesem Experiment die Reduktion

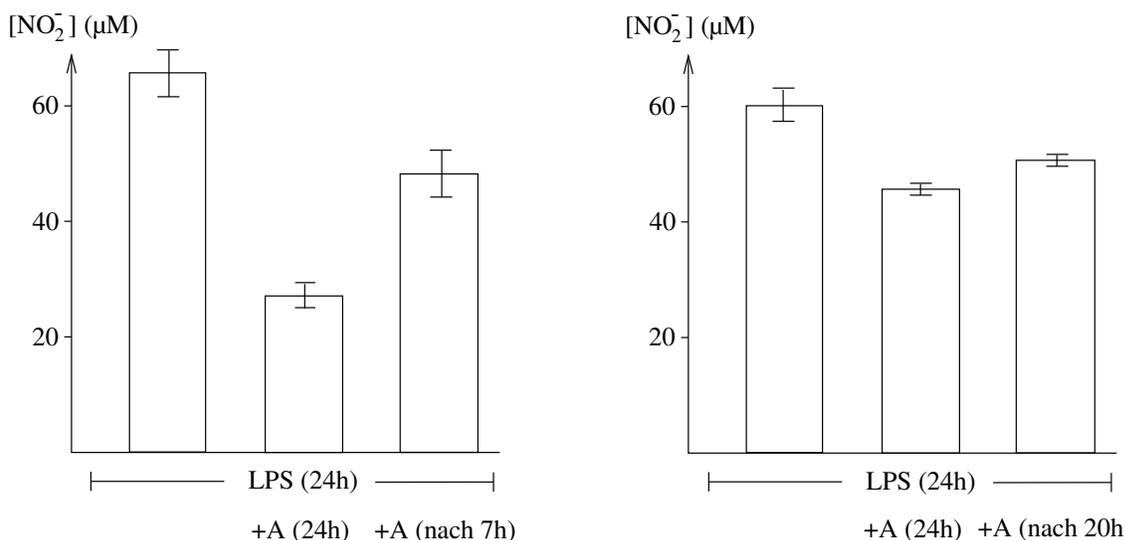


Abbildung 2.19: Einfluss von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in N11-Zellen in Abhängigkeit der Dauer der Anwesenheit von Aspirin[®]. N11-Zellen der Passage 36 wurden 24 Stunden lang mit LPS inkubiert. Zusätzlich wurde dem Medium bei einem Teil der Ansätze Aspirin[®] (10 mM) nach 7 Stunden bzw. 20 Stunden zugegeben. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen. Es wurden jeweils drei Kulturschalen desselben Ansatzes vermessen. (A = Aspirin[®] (10 mM)).

der Nitritproduktion bei Gegenwart von Aspirin[®] von Beginn der Inkubation an 59%, dagegen nur 37%, wenn Aspirin[®] erst nach sieben Stunden dem Inkubationsmedium zugegeben wurde. In einem weiteren Experiment war Aspirin[®] entweder 24 Stunden während der gesamten Inkubation mit LPS anwesend oder nur (wieder zugegeben aus einer Stammlösung) während der letzten vier Stunden. Auch in diesem Experiment war die Reduktion der Nitritkonzentration geringer, wenn Aspirin[®] nur während der letzten Stunden der Inkubation anwesend war (15%, gegenüber 23% bei 24 Stunden Gegenwart von Aspirin[®]; Abbildung 2.19).

Ein weiteres Experiment wurde so durchgeführt, dass nach einer bestimmten Zeit (6 Stunden bzw. 18.5 Stunden) das Medium der Kulturschalen, das wie üblich LPS oder LPS und Aspirin enthielt, durch ein LPS-freies Medium mit oder ohne Aspirin[®] ersetzt wurde. Dadurch wurde das bis zu diesem Zeitpunkt bereits gebildete Nitrit mitentfernt, was bei der Interpretation der gemessenen Nitritkonzentrationen zu berücksichtigen ist. Die Resultate der Nitritbestimmung nach insgesamt 24 bzw. 22.5 Stunden sind in Abbildung 2.20 dargestellt. Es zeigt sich, dass nach einer Induktion mit LPS für eine bestimmte Zeit auch in Abwesenheit des Induktors eine Nitritkonzentration im Medium gemessen werden konnte, die auf eine in etwa gleich

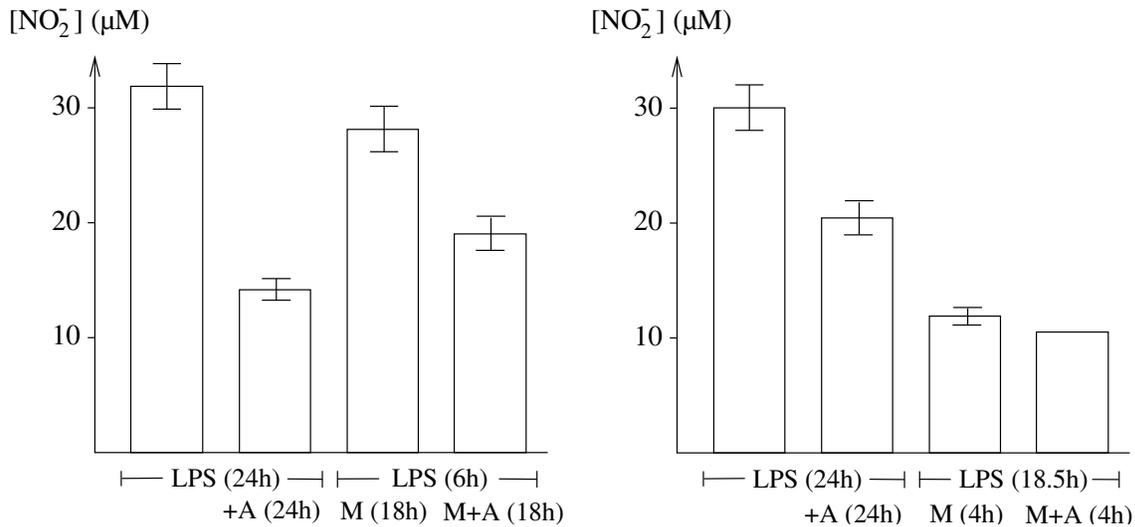


Abbildung 2.20: Einfluss von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in N11-Zellen in Abhängigkeit der Zugabe frischen Mediums mit verschiedenen Zusätzen. N11-Zellen der Passage 36 wurden die angegebenen Zeiten lang mit LPS oder mit LPS und Aspirin[®] (10 mM) inkubiert. Bei einem Teil der Ansätze wurde nach 6 h bzw. 18.5 h das Medium abgesaugt und durch LPS-freies Medium mit oder ohne Aspirin[®] ersetzt. Nach 24 h bzw. nach 22.5 h wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen. Es wurden jeweils 3 Kulturschalen desselben Ansatzes vermessen. (A = Aspirin[®] (10 mM), M = Medium ohne Zusätze).

hohe NO-Produktionsrate schließen lässt wie bei 24-stündiger Inkubation mit LPS. Dabei war die Nitritkonzentration bei einer zusätzlichen Inkubation mit Aspirin[®] von 18 Stunden um 32% geringer und um 13% geringer bei einer zusätzlichen Inkubation von vier Stunden.

Schließlich wurden die experimentellen Bedingungen dahingehend abgeändert, dass in einem Teil der Kulturschalen nach vier Stunden Inkubation mit LPS, Medium ohne Induktor auf die Zellen gegeben wurde. Nach weiteren 19.5 Stunden wurde einem Teil dieser Schalen Aspirin[®] aus einer Stammlösung zugegeben, so dass es in einer Konzentration von 10 mM weitere vier Stunden im Medium vorhanden war. Das Ergebnis der Nitritbestimmung zeigt Abbildung 2.21. Es zeigt sich, wie auch schon im vorherigen Experiment, dass in der Tat nach Wegnahme des Induktors LPS schon nach vier Stunden die iNOS viele Stunden lang NO produziert, das als Nitrit gemessen werden kann. Bei Gegenwart von Aspirin[®] während der letzten vier Stunden Inkubation ohne LPS verringerte sich die messbare Nitritkonzentration um etwa 7%.

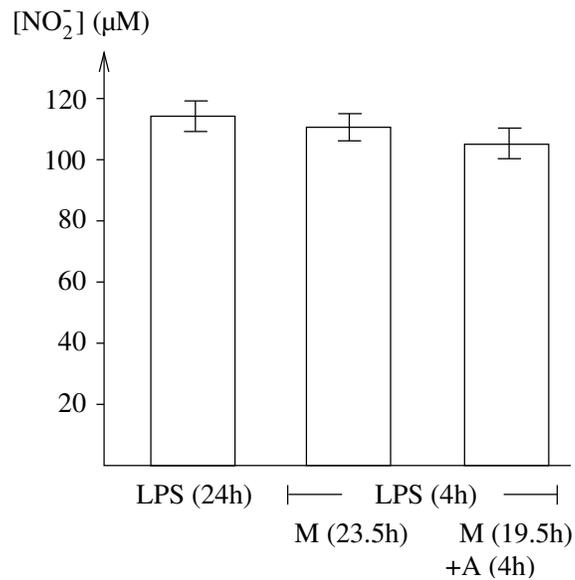


Abbildung 2.21: Einfluss von Aspirin[®] auf die induzierte NO-Produktion in N11-Zellen in Abhängigkeit der Zugabe zu frischem Medium M. N11-Zellen der Passage 37 wurden die angegebenen Zeiten lang mit LPS inkubiert. Bei einem Teil der Schalen wurde nach 4 h das Medium abgesaugt und durch Medium ohne LPS ersetzt, das wiederum bei einem Teil der Schalen nach 19.5 h mit Aspirin[®] (Endkonzentration 10 mM) versetzt wurde. Nach 27.5 h wurde die Nitritkonzentration aller Medien gemessen. Es wurden jeweils drei Kulturschalen desselben Ansatzes vermessen. (A = Aspirin[®] (10 mM), M = Medium ohne Zusätze).

2.4 Bestimmung der LDH-Aktivität

Bei Betrachtung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde festgestellt, dass N11-Zellen, die mit Aspirin[®] behandelten worden waren, nicht mehr fest am Boden der Plastikschaale angeheftet waren, sondern sich zum Teil abgelöst hatten. Die Zellen schwammen zwar nicht völlig frei im Medium herum, waren aber nur noch lose mit dem Untergrund verbunden. Morphologische Veränderungen wurden dabei nicht beobachtet. Es waren etwa 30%–50% der N11-Zellen betroffen, C6-BU-1-Zellen dagegen waren auch nach Immunstimulation fest mit dem Substrat verhaftet.

Um zu überprüfen, ob Aspirin[®] cytotoxisch wirkt, wurde die Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) ins Medium gemessen. Dabei wurden Zellen, die mit Aspirin[®] behandelt worden waren, mit unbehandelten Zellen verglichen. N11-Zellen und C6-BU-1-Zellen wurden 20 Stunden lang mit Medium ohne Zusätze, mit den Stimulantien LPS und IFN- γ oder mit den Stimulantien und Aspirin[®] inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die LDH-Aktivität wurde in den Lysaten und im Medium gemessen. Aus der Summe der beiden Messwerte wurde die Gesamt-LDH-Aktivität berechnet.

Ergebnisse: Sowohl bei N11-Zellen als auch bei C6-BU-1-Zellen wurden etwa 10% der Gesamt-LDH-Aktivität im Medium gefunden. Durch die Inkubation der Zellen mit Immunstimulantien und Aspirin[®] wurde dieser Anteil nur geringfügig verändert. Bei den Zellen, die mit Aspirin[®] behandelt worden waren, war der im Medium enthaltene Anteil der Gesamt-LDH-Aktivität etwas höher als bei den unbehandelten Zellen oder bei den nur mit den Stimulantien behandelten Zellen (siehe Tabelle 2.1). Betrachtet man die Gesamt-LDH-Aktivität, so fällt auf, dass diese bei den mit Aspirin[®] behandelten Zellen um etwa 30% reduziert war (siehe Tabelle 2.2).

2.5 Effekte von Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

AGEs wurden untersucht, da es sich dabei um Substanzen handelt, die möglicherweise für die Pathophysiologie der Alzheimer-Erkrankung relevant sind. AGEs sind gealterte Proteine, die durch nichtenzymatische Reaktion mit Glucose modifiziert wurden. Sie werden unter anderem in Alzheimer-Läsionen im Gehirn gefunden und

Tabelle 2.1: LDH-Freisetzung ins Medium nach Inkubation der Zellen mit und ohne Aspirin[®]. Die LDH-Aktivität im Medium ist als Anteil der Gesamt-LDH-Aktivität in Prozent angegeben. Die Gesamt-LDH-Aktivität wurde als die Summe der LDH-Aktivität im Medium und der LDH-Aktivität in den Zellhomogenaten berechnet. Das Experiment wurde als 3-fach-Bestimmung durchgeführt. s = Standardabweichung.

N11-Zellen (Passage 50)

Bedingung	LDH-Aktivität im Medium	s
Kontrolle	10.1%	1.5%
LPS	8.5%	0.6%
LPS+Aspirin [®]	13.5%	1.0%

C6-BU-1-Zellen (Passage 27)

Bedingung	LDH-Aktivität im Medium	s
Kontrolle	9.2%	1.1%
LPS+IFN- γ	10.0%	0.9%
LPS+IFN- γ +Aspirin [®]	11.5%	2.1%

Tabelle 2.2: Reduktion der Gesamt-LDH-Aktivität durch die Behandlung der Zellen mit Aspirin[®]. Gemessen wurden die LDH-Aktivität im Kulturmedium und die LDH-Aktivität in den Zellhomogenaten, die Gesamt-LDH-Aktivität wurde als Summe der beiden Messwerte berechnet. Das Experiment wurde als 3-fach-Bestimmung durchgeführt. s = Standardabweichung.

N11-Zellen (Passage 50)

Bedingung	Gesamt-LDH-Aktivität	s
Kontrolle	17.2 mU	0.2 mU
LPS	16.7 mU	0.3 mU
LPS+Aspirin [®]	12.4 mU	0

C6-BU-1-Zellen (Passage 27)

Bedingung	Gesamt-LDH-Aktivität	s
Kontrolle	14.1 mU	0.3 mU
LPS+IFN- γ	13.8 mU	0.3 mU
LPS+IFN- γ +Aspirin [®]	10.0 mU	0.2 mU

stehen im Verdacht, eine chronische Entzündungsreaktion mit Induktion der iNOS hervorzurufen [87, Münch et al., 1997] [137, Wong et al., 2001].

Als AGE-Modell wurde in unseren Experimenten Serumalbumin eingesetzt, dessen Lysinreste zu Carboxymethyllysin modifiziert worden waren (Carboxymethyllysin-Albumin = CML) [112, Schleicher et al., 1997]. Als Kontrolle diente nicht oder nur schwach modifiziertes Serumalbumin. Es wurden zwei unterschiedliche Chargen (CML-1, CML-2) verwendet, wobei nur bei CML-2 die Konzentration bekannt war. Untersucht wurden die Zelllinie N11 als Microgliamodell, astrogliareiche Rattenglia-Primärkulturen und reine Astroglia-Kulturen von der Maus. In diesen Zellen sollte der Einfluss von CML auf die NO-Produktion untersucht werden. Dazu wurden die Zellen 20 Stunden lang mit verschiedenen Kombinationen aus LPS, IFN- γ , CML oder Serumalbumin inkubiert. Als Maß für die NO-Produktion wurde anschließend die Nitritkonzentration im Medium gemessen.

2.5.1 Effekt von Carboxymethyllysin-Albumin allein

Zunächst wurde untersucht, ob sich die NO-Produktion mit CML allein induzieren lässt. Die Zellen wurden dazu 20 Stunden lang mit CML in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und anschließend wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen. Es wurden drei Experimente mit N11-Zellen, ein Experiment mit astrogliareichen Primärkulturen und ein Experiment mit reinen Astroglia-Kulturen durchgeführt. CML-1 und Serumalbumin der ersten Charge wurden in der Verdünnung 1:100 oder 1:1000 eingesetzt, CML-2 und Serumalbumin der zweiten Charge in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$, 48 $\mu\text{g/ml}$ und 480 $\mu\text{g/ml}$.

Lediglich bei N11-Zellen wurde in zwei Experimenten ein minimaler Anstieg der Nitritkonzentration nach Inkubation mit CML-2 in einer Konzentration von 480 $\mu\text{g/ml}$ gefunden. Die Nitritkonzentration stieg von 3 μM bei Inkubation mit Medium allein bzw. 4 μM bei Inkubation mit Serumalbumin auf 6 μM bei Inkubation mit CML-2 an. Bei den restlichen Experimenten wurde kein Anstieg der Nitritkonzentration im Medium nach Inkubation mit CML gefunden (Daten nicht gezeigt).

2.5.2 Einfluss von Carboxymethyllysin-Albumin auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion

Nachdem mit CML allein die NO-Produktion nicht induziert werden konnte, sollte

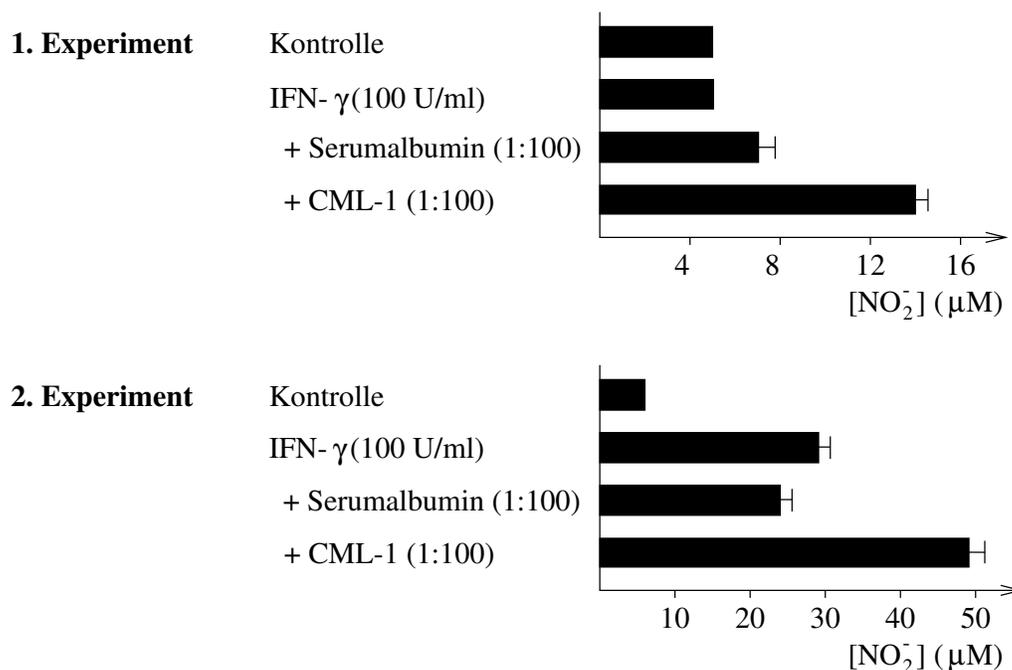


Abbildung 2.22: Einfluss von CML-1 auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion in astrogliareichen Primärkulturen. Die Zellen wurden 20 h lang mit IFN- γ (100 U/ml) und zusätzlich mit Serumalbumin oder CML-1 inkubiert. Danach wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen. Das Experiment wurde als 3-fach-Bestimmung durchgeführt.

untersucht werden, ob die durch durch INF- γ induzierte NO-Produktion verändert wird, wenn zusätzlich mit CML inkubiert wird.

Astrogliareiche Primärkulturen: Es wurden zwei Experimenten mit astrogliareichen Primärkulturen von der Ratte durchgeführt. Dabei wurde nur CML-1 und Serumalbumin der ersten Charge verwendet und in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, IFN- γ wurde in einer Konzentration von 100 U/ml eingesetzt. Die Ergebnisse der beiden Experimenten sind in Abbildung 2.22 dargestellt.

Bei beiden Experimenten verstärkte CML-1 die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion. Nach Inkubation mit CML-1 und IFN- γ gemeinsam war die Nitritkonzentration im Medium etwa doppelt so hoch wie nach Inkubation mit IFN- γ allein. Bei Kombination von IFN- γ mit Serumalbumin war dieser Effekt nicht zu beobachten.

N11-Zellen: Der Einfluss von CML auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion in N11-Zellen wurde in mehreren Experimenten untersucht. Es wurden CML-1 und CML-2 verwendet und in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Da ver-

mutet wurde, dass eine zusätzliche Stimulation durch CML nicht möglich ist, wenn die NO-Produktion bereits mit IFN- γ allein maximal induziert ist, wurde IFN- γ auch in niedrigen Konzentrationen eingesetzt. Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 2.23 und 2.24 dargestellt.

Bei den Experimenten, die mit CML-1 und Serumalbumin der ersten Charge durchgeführt wurden, führte CML-1 zu einer Steigerung der durch IFN- γ induzierten NO-Produktion, während Serumalbumin diesen Effekt nicht hatte (Abbildung 2.23).

In weiteren Experimenten, bei denen CML-2 und Serumalbumin der zweiten Charge verwendet wurden, war keine eindeutige Steigerung der NO-Produktion durch CML mehr nachweisbar, wenn IFN- γ in einer Konzentration von 100 U/ml anwesend war. Wurde dagegen in einer Konzentration von 10 U/ml stimuliert, so reduzierte CML-2 konzentrationsabhängig die Nitritkonzentration im Medium (Abbildungen 2.24).

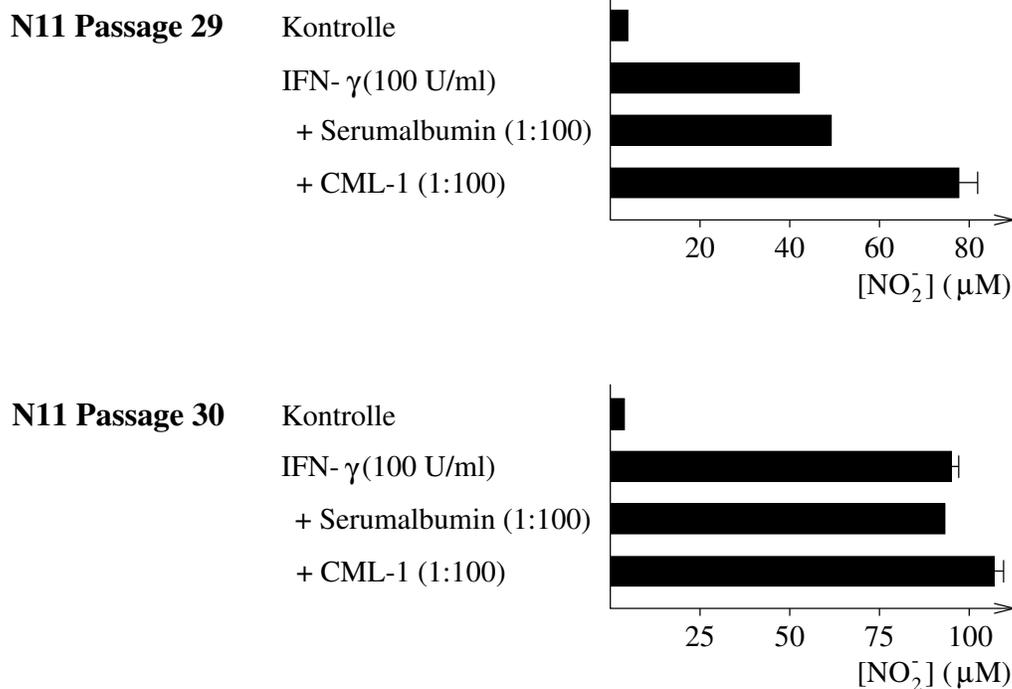


Abbildung 2.23: Einfluss von CML-1 auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion in N11-Zellen. N11-Zellen wurden 20 h lang mit IFN- γ und zusätzlich mit Serumalbumin oder CML-1 inkubiert. Danach wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen. Die Experimente wurden als Doppel-Bestimmung durchgeführt.

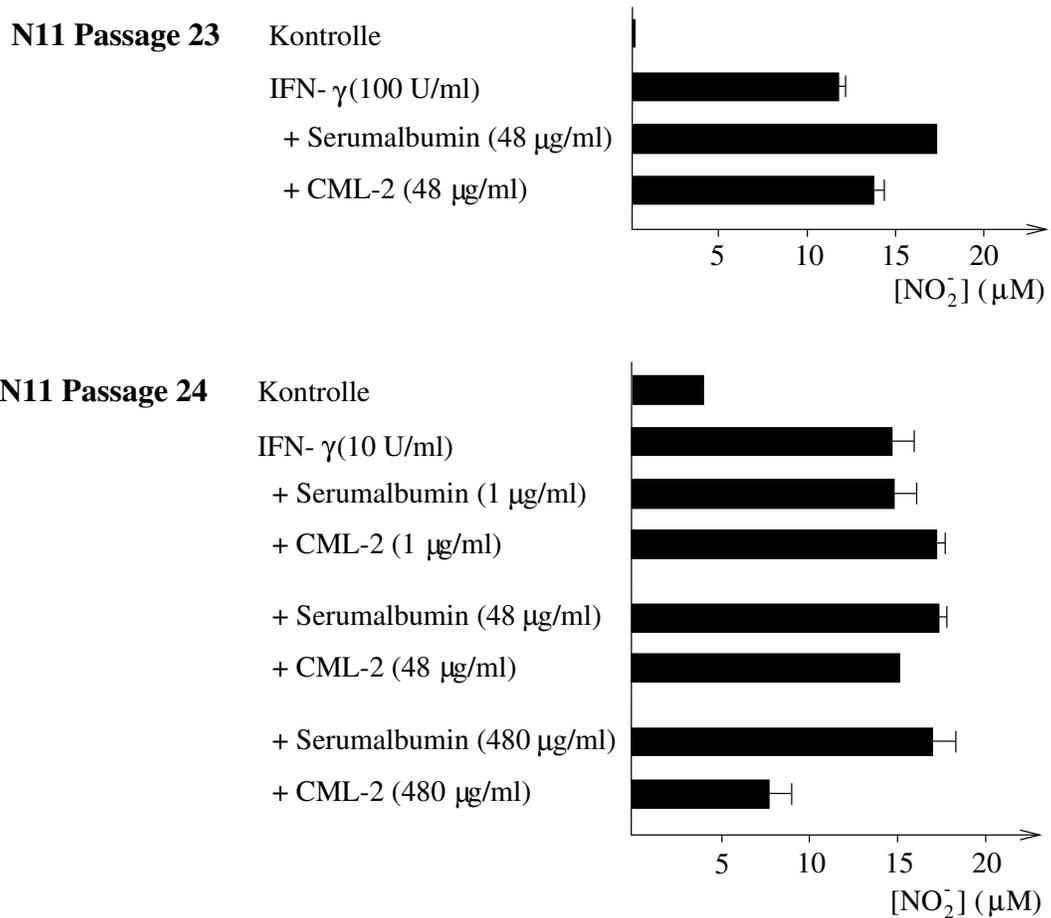


Abbildung 2.24: Einfluss von CML-2 auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion in N11-Zellen. N11-Zellen wurden 20 h lang mit IFN- γ und zusätzlich mit Serumalbumin oder CML-2 inkubiert. Danach wurde die Nitritkonzentration im Medium gemessen (oben: Doppel-Bestimmung, unten: 3-fach-Bestimmung).

Astrocyten-Primärkulturen: Es wurde ein Experiment mit reinen Astrocyten-Primärkulturen von der Maus durchgeführt. Bei diesem Experiment hatte weder CML-2 noch Serumalbumin einen wesentlichen Effekt auf die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion. CML-2 wurde in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 480 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt, die Konzentration von IFN- γ war 100 U/ml. Nach Inkubation der Zellen mit IFN- γ wurde eine Nitritkonzentration im Medium von 9.5 μM gemessen. Bei Inkubation mit einer Kombination von IFN- γ und CML-2 oder Serumalbumin schwankten die im Medium gemessenen Nitritkonzentrationen zwischen 7 μM und 9.5 μM (Daten nicht gezeigt).

2.5.3 Einfluss von Carboxymethyllysine-Albumin auf die durch LPS induzierte NO-Produktion

Der Einfluss von CML und Serumalbumin auf die durch LPS induzierte NO-Produktion wurde in acht Experimenten untersucht. Bei diesen Experimenten hatte weder CML noch Serumalbumin einen wesentlichen Einfluss auf die durch LPS induzierte NO-Produktion. Folgende Zellen wurden untersucht: N11-Zellen, astroglia-reiche Rattengliaprimärkulturen und reine Astrocytenkulturen von der Maus. Die Zellen wurden 20 Stunden lang mit LPS allein oder mit einer Kombination von LPS mit CML oder mit Serumalbumin inkubiert. LPS wurde in Konzentrationen von 10 ng/ml bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. CML und Serumalbumin stammten sowohl von der ersten als auch von der zweiten Charge und wurden in der Verdünnung 1:100 bzw. in den Konzentrationen 1, 48 oder 480 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet.

Die im Medium gemessenen Nitritkonzentrationen waren bei den Zellen, die mit der Kombination von LPS mit CML oder mit Serumalbumin inkubiert worden waren, geringfügig höher oder geringfügig niedriger als bei den Zellen, die mit LPS allein inkubiert worden waren. Eine einheitliche Tendenz in Richtung Erhöhung oder Reduktion wurde dabei nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Kapitel 3

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte der Regulation der induzierbaren NO-Produktion im ZNS, insbesondere in Gliazellen untersucht.

Die induzierbare NO-Produktion und das NO-generierende Enzym, die iNOS, wurden in den letzten Jahren ausführlich untersucht. Es sind zahlreiche Substanzen bekannt, die die NO-Produktion durch die iNOS entweder induzieren oder hemmen (siehe Kap. 1.1.4). Neben der iNOS selbst wird die physiologische NO-Produktion offenbar auch auf dem Niveau des Argininstoffwechsels reguliert [85, Morris, 2000] [135, Wiesinger, 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb in ausgewählten Systemen der Einfluss von Modulatoren der iNOS auf den Argininstoffwechsel in glialen Zellen untersucht. Im Hauptteil der Arbeit wurden Aspirin[®] und TGF- β untersucht. Von beiden Substanzen war bekannt, dass sie die NO-Produktion und die Expression der iNOS in kultivierten Zellen hemmen können [67, Kepka-Lenhart et al., 1996] [132, Vodovotz, 1997].

Zusätzlich wurde der Einfluss von AGEs auf die NO-Produktion untersucht, da hierbei aber kein eindeutiger Effekt gefunden wurde, wurde auf die weiterführende Untersuchung des Argininstoffwechsels verzichtet.

Zunächst sollen jedoch die grundlegenden Experimente zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit und der Toxizität von Aspirin[®] diskutiert werden.

3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Aspirin[®]

Um eine geeignete Konzentration für unsere Experimente zu finden, wurde der Einfluss von Aspirin[®] in verschiedenen Konzentrationen auf die induzierte NO-Produktion

tion geprüft. Untersucht wurde das Microgliamodell der N11-Zellen.

In früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass Aspirin[®] die NO-Produktion und die Expression der iNOS inhibieren kann. Bei Experimenten mit einer Macrophagenzelllinie der Maus (RAW 264.7) wurde ein signifikanter Effekt für Aspirinkonzentrationen über 1 mM gefunden [4, Amin et al., 1995] [67, Kepka-Lenhart et al., 1996]. In kultivierten murinen Microgliazellen hemmte Natriumsalicylat die induzierte NO-Synthese ab Konzentrationen von 5 mM [69, Kim et al., 1998].

In unseren Experimenten wurde eine eindeutige Inhibition der durch LPS induzierten NO-Produktion ab einer Aspirinkonzentration von 3 mM gefunden, höhere Konzentrationen verstärkten die Inhibition. Für die weiteren Experimente wurde eine Konzentration von 10 mM gewählt. Diese Konzentration liegt allerdings weit über der Konzentration, die im Blut beim therapeutischen Einsatz von Aspirin[®] erreicht wird. — Aspirin[®] wird in der Schmerztherapie bei Erwachsenen in Einzeldosierungen von 500 mg eingesetzt. Bei einem Verteilungsvolumen von 0.2 l/kg Körpergewicht und einer Bioverfügbarkeit von 100% entspricht dies einer Blutplasmakonzentration von 0.2 mM. Im „Arzneimittel-Kompendium der Schweiz“ wird eine maximale Plasmakonzentration von 0.14 mM nach einmaliger oraler Einnahme von 500 mg Aspirin[®] angegeben. Berücksichtigt man nun noch, dass ca. 80% der Acetylsalicylsäure an Plasmaproteine gebunden ist, beträgt die Konzentration der pharmakologisch wirksamen Acetylsalicylsäure nach Einnahme von 500 mg Aspirin[®] etwa 50 μ M. — Diese theoretischen Überlegungen lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Situation in vivo übertragen. Beispielsweise reichert sich die Acetylsalicylsäure aufgrund ihrer Säure-Eigenschaften im sauren Milieu von entzündlich verändertem Gewebe an, so dass die Konzentrationen am Wirkort über der Konzentration im Plasma liegen können. Außerdem wurde in unseren Experimenten immer nur ein Zeitraum von 24 Stunden beobachtet, bei Langzeittherapie mit NSAIDs über Wochen oder Jahre, wie z.B. bei rheumatischen Erkrankungen, könnten jedoch auch geringe Effekte bei niedrigen Konzentrationen relevant sein.

Für die Möglichkeit, die Ergebnisse von Experimenten mit Aspirin[®] in Gehirnzellkulturen auf die in vivo-Situation zu beziehen, ist es wesentlich, dass systemisch gegebenes Aspirin[®] die Blut-Hirn-Schranke in ausreichender Menge durchquert. Dies ist tatsächlich der Fall [59, Jakovljevic et al., 1991]. [27, Brune und Neubert, 2001].

3.2 Toxizität von Aspirin[®]

Die Zellen wurden am Ende der Inkubationszeit immer unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Dabei fiel auf, dass N11-Zellen, die mit 10 mM Aspirin[®] inkubiert worden waren, nicht mehr fest am Boden der Plastikschale angeheftet waren, sondern sich zum Teil abgelöst hatten. Die Zellen schwammen zwar nicht völlig frei im Medium herum, waren aber nur noch lose mit dem Substrat verbunden. Morphologische Veränderungen wurden dabei nicht beobachtet. Es waren etwa 30%–50% der Zellen betroffen; Diese Lockerung der Zelladhäsion wurde allerdings nur bei N11-Zellen beobachtet. Aufgrund dieser Beobachtung und da Aspirin[®] in einer Konzentration eingesetzt wurde, die weit über dem therapeutischen Bereich liegt, stellte sich die Frage nach der Toxizität von Aspirin[®] in der verwendeten Konzentration. Um zu prüfen ob Aspirin[®] in einer Konzentration von 10 mM die Zellen tatsächlich schädigt, wurde die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) ins Kulturmedium quantifiziert.

Von anderen Autoren wurde mit dem Trypanblau-Test die Überlebensfähigkeit von RAW 264.7-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 0, 3, 10 oder 20 mM Acetylsalicylsäure gemessen; sie betrug 95, 93.5, 95 und 86% [67, Kepka-Lenhart et al., 1996].

Bei unseren Experimenten wurde keine wesentlich erhöhte Freisetzung der LDH nach Inkubation der Zellen mit Aspirin[®] gefunden, weder bei N11-Zellen noch bei C6-BU-1-Zellen. Allerdings war die Gesamt-LDH-Aktivität bei den Zellen, die 20 Stunden lang zusätzlich mit 10 mM Aspirin[®] inkubiert worden waren, um etwa 30% reduziert. Dies könnte auf eine spezifische Hemmung der LDH durch Acetylsalicylsäure, beispielsweise durch Acetylierung, zurückzuführen sein. Ein Kontrollexperiment mit Aspirin[®] allein könnte darüber Aufschluss geben. Da die Reduktion der totalen LDH-Aktivität auch bei den C6-BU-1-Zellen auftrat, die nach Behandlung mit Aspirin[®] noch fest am Boden hafteten, kann ein Absaugen der Zellen in den Waschrufen des Experiments kaum für den Aktivitätsverlust verantwortlich gemacht werden. Eine generelle Störung der Genexpression ist unwahrscheinlich, darauf weisen auch die weiter unten diskutierten Ergebnisse des Nachweises von ASL-Protein mittels Western-Blot hin. Da keine LDH aus den Zellen freigesetzt wurde, ist eine Zellschädigung nicht anzunehmen.

3.3 Wirkung von Aspirin[®]

3.3.1 Wirkung von Aspirin[®] auf ASS und iNOS

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Aspirin[®] und andere NSAIDs die induzierte NO-Produktion in Microgliazellen [69, Kim et al., 1998] [36, Du und Li, 1999] und in verschiedenen peripheren Zellarten hemmen [4, Amin et al., 1995] [109, Sakitani et al., 1997] [98, Ogawa et al., 2000]. Ein Teil der antiinflammatorischen Wirkung von Aspirin[®] könnte also auf der Reduktion der NO-Produktion in Entzündungszellen beruhen. Die Inhibition findet auf Stufe der Transkription (Inhibition der Aktivierung von NF- κ B) oder der Translation statt. In einer Studie wurde außerdem berichtet, dass Acetylsalicylsäure NO direkt inaktiviert [8, Asanuma et al., 2001]. Die Inhibition der Cyclooxygenase ist an der Hemmung der NO-Produktion nicht beteiligt [4, Amin et al., 1995]. In einzelnen Veröffentlichungen wurde auch über stimulierende Effekte von Aspirin[®] auf die NO-Produktion berichtet. So liegen zur Wirkung von Aspirin[®] auf die durch IL-1 β induzierte NO-Produktion in kultivierten glatten Muskelzellen widersprüchliche Ergebnisse vor: Für glatte Muskelzellen von der Ratte bzw. vom Rind wurde sowohl über eine Hemmung [63, Katsuyama et al., 1999] [110, Sanchez de Miguel et al., 1999] als auch über eine Verstärkung [120, Shimpo et al., 2000] der durch IL-1 β induzierten NO-Produktion durch Aspirin[®] berichtet. Außerdem wurde in einer Macrophagenzelllinie der Maus gezeigt, dass Salicylat die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-1 durch IFN- γ verstärkt, während es die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der durch LPS aktiviert wird, inhibiert [67, Kepka-Lenhardt et al., 1996]; [32, Chen et al., 1999].

Die Wirkung von Aspirin[®] auf den Argininstoffwechsel wurde unseres Wissens nach bisher nur in einer Veröffentlichung, in der eine Macrophagenzelllinie der Maus (RAW 264.7) untersucht wurde, beschrieben. Es wurde berichtet, dass Acetylsalicylsäure und Natriumsalicylat jeweils die Induktion der ASS-mRNA durch LPS oder IFN- γ hemmen [67, Kepka-Lenhardt et al., 1996]. In dieser Studie wurde auch berichtet, dass die Induktion der iNOS-mRNA nur dann inhibiert wird, wenn die Zellen mit LPS stimuliert werden, nicht aber wenn sie mit IFN- γ stimuliert werden. Aus der unterschiedlichen Wirkung von Aspirin[®] auf ASS und iNOS wurde geschlossen, dass die ASS über einen anderen Mechanismus reguliert wird als die iNOS.

N11-Zellen In unseren Experimenten wurde gezeigt, dass Aspirin[®] in N11-Zellen die **NO-Produktion** und die Induktion des **iNOS**-Proteins sowohl in LPS- als auch in IFN- γ -stimulierten N11-Zellen hemmt. Die Microgliazelllinie N11 verhält sich also ähnlich wie die Macrophagenzelllinie RAW 264.7, bei der Aspirin[®] in Konzentrationen zwischen 3 und 10 mM die induzierte NO-Produktion und die Expression des iNOS-Proteins hemmte. Diese Hemmung geschah unabhängig vom Effekt von Aspirin[®] auf die iNOS-mRNA, die entweder reduziert (bei Induktion durch LPS) oder erhöht (bei Induktion durch IFN- γ) wurde [67, Kepka-Lenhart et al., 1996]. Ein Teil der Reduktion der NO-Produktion in N11-Zellen mag aber auch durch direktes Wegfangen von NO durch Aspirin[®] verursacht sein (siehe Kap. 3.3.3). Auf jeden Fall wird durch Aspirin[®] die Produktion einer potentiell neurotoxischen Substanz der Microgliazellen erheblich reduziert, so wie das Arzneimittel die Freisetzung von ebenfalls neurotoxischem PGE₂ aus diesem Zelltyp inhibiert [39, Fiebich et al., 2003] [107, Rozenfeld et al., 2003].

Bei der Untersuchung der **ASS**-Expression in N11-Zellen mittels Western Blot konnte das ASS-Protein auch nach Stimulation mit LPS oder IFN- γ nicht sicher nachgewiesen werden, die Zellen enthielten allenfalls Spuren von ASS. Beim Nachweis der ASS-mRNA mittels RT-PCR war dagegen ASS-mRNA auch in unstimulierten Zellen nachweisbar. Die Stimulation der Zellen mit LPS oder IFN- γ verstärkte die Expression der ASS-mRNA deutlich, Aspirin[®] noch etwas mehr. Damit wurden die Ergebnisse früherer Versuche bestätigt, bei denen die ASS in N11-Zellen zwar durch Immunocytochemie nachgewiesen werden konnte, nicht aber im Western Blot [115, Schmidlin, 1996]. In anderen Veröffentlichungen wurde dagegen der Nachweis der ASS in Microgliazellen in vivo bzw. in der Microgliazelllinie MG5 nach Induktion durch LPS oder IFN- γ immunhistochemisch bzw. im Western Blot beschrieben [50, Heneka et al., 1999] [66, Kawahara et al., 2001]. Dies könnte bedeuten, dass dieser Phänotyp bei N11-Zellen durch die Transformation verlorengegangen ist oder aber dass unser Antiserum für den Nachweis von ASS in N11-Zellen nicht geeignet ist. Leider kann aber deshalb keine Aussage darüber getroffen werden, ob die leichte Stimulation der ASS-Transkription durch Aspirin[®] auf der Ebene der Translation wieder aufgehoben wird.

C6-BU-1-Zellen Auch in C6-BU-1-Zellen wurde der Einfluss von Aspirin[®] auf die NO-Produktion und auf die Expression der ASS untersucht. In diesen Experimenten wurde erstmals in einem Astrocytenmodell gezeigt, dass Aspirin[®] die Induktion der **NO-Produktion** durch LPS und IFN- γ hemmt. iNOS- und ASS-Protein wurden im Western Blot nachgewiesen. Die **iNOS** wurde mit einer Kombination von LPS und IFN- γ induziert. Es wurden jedoch auch in stimulierten Zellen nur geringe Mengen des iNOS-Proteins gefunden. Dies passt gut zu der im Vergleich mit den N11-Zellen geringen NO-Produktion. Die Behandlung der Zellen mit Aspirin[®] führte zu keiner erkennbaren Inhibition der Induktion des iNOS-Proteins. Diese Aussage ist allerdings bei der insgesamt geringen Expression des iNOS-Proteins mit Vorsicht zu betrachten. Die Inhibition der induzierten NO-Produktion ist also nach unseren Erkenntnissen nicht durch eine verminderte Menge an iNOS-Protein zu erklären. Ein direktes Abfangen von NO durch die Acetylsalicylsäure kommt als Erklärung in Frage (siehe Kap. 3.3.3).

ASS-Protein war auch in unstimulierten C6-BU-1-Zellen in geringen Mengen nachweisbar, die Stimulation der Zellen mit LPS und IFN- γ führte zu einer Steigerung der Expression, wie es schon beschrieben war [116, Schmidlin et al., 1997], durch Aspirin[®] wurde die Induktion des ASS-Proteins — im Gegensatz zur iNOS — stark gehemmt. Die Inhibition der ASS-Expression durch Aspirin[®] wurde auch in subkultivierten Astrogliaulturen gefunden.

Astrogliazellen Die Experimente mit nicht-transformierten Astrogliazellen legen nahe, dass die Induzierbarkeit der **iNOS** zu den Funktionen gehört, die mit zunehmender Passagierung der Zellen verloren gehen. Solch eine „Dedifferenzierung“ ist z.B. für Kapillarendothelzellen beschrieben: nach mehrfacher Passagierung sind in Kultur weder Glucosetransporter noch γ -Glutamyltranspeptidase nachweisbar, die Abnahme des elektrischen Widerstands deutet außerdem auf einen Verlust der „tight junctions“ zwischen den Zellen hin [108, Rubin und Staddon, 1999]. Andererseits zeigen die Versuche klar dass reine Astrogliaulturen in der Lage sind, iNOS nach Behandlung mit Immunstimulantien zu exprimieren. Nur in Gegenwart einer auch nur geringen Anzahl von Microgliazellen wird die Induzierbarkeit der iNOS in Astrocyten vollständig unterdrückt [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998] [95, Noack et al., 2000]. Ergebnisse in Zusammenhang mit dem NO-Weg sind deshalb in glialen

Mischkulturen sehr vorsichtig zu interpretieren, da der aktuelle Prozentsatz an Microgliazellen einen entscheidenden Einfluss auf die Experimente haben mag (siehe Kap. 2.1.5 und Ausführungen zu TGF- β).

Die Dedifferenzierung gilt offensichtlich nicht für die ASS, die auch in subkultivierten Astrogliazellen deutlich nachweisbar war. Dies mag ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Signaltransduktionswege für die iNOS und die Proteine des Argininstoffwechsels getrennt sind [114, Schmidlin und Wiesinger, 1995].

Schlussfolgerung Da in unseren Experimenten die Expression des iNOS-Proteins in C6-BU-1-Zellen nicht durch Aspirin[®] beeinflusst wurde, die ASS-Expression dagegen stark gehemmt wurde, besteht die Möglichkeit, dass die beobachtete Inhibition der NO-Produktion durch Aspirin[®] in C6-BU-1-Zellen dadurch bedingt ist, dass weniger Citrullin zu Arginin umgesetzt wird und die Zelle deshalb an Substrat für die iNOS verarmt. In N11-Zellen, in denen die Expression des iNOS-Proteins durch Aspirin[®] deutlich gehemmt wird, wurde dagegen keine wesentliche Änderung der ASS-mRNA-Expression durch Aspirin[®] nachgewiesen. Der Nachweis des ASS-Proteins im Western Blot gelang nicht, möglicherweise weil unsere Vorschrift nicht geeignet war. Von zahlreichen Autoren wird jedoch angenommen, dass die induzierte NO-Produktion wesentlich vom Angebot an extrazellulärem Arginin und der Induktion des Arginintransporters CAT-2 abhängt (siehe Kap. 1.2.2) so dass in N11-Zellen das Argininangebot über die Expression von CAT-2 reguliert werden könnte. Darüber hinaus könnte unter der Annahme eines interzellulären Citrullin-NO-Zyklus in vivo (siehe Kap. 1.2.1), in dem Astrocyten das Recycling von Citrullin zu Arginin übernehmen [135, Wiesinger, 2001], die Inhibition der ASS in Astrocyten über ein verringertes Argininangebot auch die NO-Produktion in Microgliazellen beeinflussen. Eine andere Bedeutung könnte der Reduktion der ASS zukommen, wenn man bedenkt, dass die iNOS bei Argininmangel O_2^- produziert, das sich mit NO zu Peroxinitrit verbindet, einem Radikal, das weitaus toxischer ist als NO selbst [15, Beckman und Koppenol, 1996]. Die Aktivität der ASS könnte so das Produkt der iNOS bestimmen.

3.3.2 Wirkung von Aspirin[®] auf die Arginintransporter CAT-1 und CAT-2A in N11-Zellen

In früheren Veröffentlichungen wurde bereits mehrfach über eine Koinduktion von iNOS und CAT-2 (CAT-2A und/oder CAT-2B) in Microgliazellen, Astrocyten, Macrophagen, Alveolarmacrophagen und in kardialen Myocyten berichtet [121, Simmons et al., 1996] [124, Stevens et al., 1996] [34, Closs et al., 2000] [43, Hammermann et al., 2000] [66, Kawahara et al., 2001]. Es wurden zwei Splicevarianten beschrieben, CAT-2A und CAT-2B, die sich in ihrer Affinität zu Arginin unterscheiden. CAT-2B hat eine um ein Vielfaches größere Affinität zu Arginin als CAT-2A [65, Kavanaugh et al., 1994]. Die entscheidende Rolle von CAT-2 bei der Argininversorgung der iNOS wurde in der Arbeitsgruppe von MacLeod in Experimenten mit Macrophagen und Astrocyten aus CAT-2-knock-out Mäusen demonstriert [93, Nicholson et al., 2001] [80, Manner et al., 2003]. CAT-2A wurde bisher nur in kardialen Myocyten, Endothelzellen und in Hepatocyten gefunden [33, Closs et al., 1993] [121, Simmons et al., 1996]. Bei CAT-1 handelt es sich um einen konstitutiv exprimierten Transporter, der in den meisten Zellarten gefunden wird. Eine Zusammenfassung der neuesten Veröffentlichungen zu CATs in Zusammenhang mit der NO-Produktion bietet der Artikel von Closs, 2002 [35].

Dass CAT-2 von Microgliazellen exprimiert wird, wurde bereits gezeigt [66, Kawahara et al., 2001], nicht bekannt ist jedoch, um welche Splicevarianten es sich dabei handelt. Auch der Effekt von Aspirin[®] auf den Arginintransport wurde bisher noch nicht untersucht. Es wurde aber von anderen Substanzen berichtet, die die Induktion des Arginintransports hemmen: Das atriale natriuretische Peptid hemmt in durch LPS aktivierten Macrophagen den Arginintransport [68, Kiemer und Vollmar, 2001], Polyamine hemmen in Alveolarmacrophagen die Induktion der CAT-2B-mRNA durch LPS [86, Mossner et al., 2001] und IL-10 hemmt die Induktion von CAT-2A-mRNA in Macrophagen [54, Huang et al., 2002].

Um die Expression der Arginintransporter **CAT-1** und **CAT-2A** zu untersuchen, wurde die Methode der RT-PCR verwendet. In unstimulierten N11-Zellen war lediglich CAT-1-mRNA nachweisbar, CAT-2A-mRNA wurde erst nach Stimulation mit LPS oder IFN- γ gefunden. Die Expression von CAT-1-mRNA wurde durch LPS oder IFN- γ nur geringfügig verstärkt. Die Inkubation mit Aspirin[®] führte sowohl bei CAT-1 als auch bei CAT-2A zu einer Inhibition der Expression in mit LPS- oder

IFN- γ stimulierten Zellen.

Schlussfolgerung In unseren Experimenten wurde erstmalig gezeigt, dass die Splicevariante CAT-2A in Microgliazellen vorkommt und gemeinsam mit der iNOS durch LPS oder IFN- γ induziert wird. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass neben CAT-2B auch CAT-2A von funktioneller Bedeutung für die NO-Produktion sein könnte. Außerdem wurde mit Aspirin[®] erstmals für ein Pharmakon gezeigt, dass es die Induktion des Arginintransports bzw. die Induktion des CAT-2A hemmt. Die Frage, ob die Inhibition der Expression von CAT-2A zu der Inhibition der NO-Produktion durch Aspirin[®] beiträgt, lässt sich an Hand unserer Ergebnisse nicht mit Sicherheit beantworten. Zwar ist von Macrophagen und Astrocyten bekannt, dass für die NO-Produktion durch die iNOS eine gleichzeitige Induktion von CAT-2 notwendig ist [93, Nicholson et al., 2001] [80, Manner et al., 2003], andere Zellarten, beispielsweise Fibrocyten, sind dagegen auch ohne CAT-2 in der Lage, NO zu produzieren [94, Nicholson et al., 2002]. Wie bei der Inhibition der ASS ist auch bei der Inhibition des Arginintransports zu bedenken, dass eine unzureichende Versorgung der iNOS mit Arginin zur Bildung von Peroxinitrit führt.

Das CAT-1-Gen scheint auf iNOS-induzierende Stimuli unterschiedlich zu reagieren. Je nach Zelltyp wurde eine Herauf- oder Herabregulierung oder gar keine Beeinflussung des konstitutiven Transporters beschrieben [35, Closs, 2002]. Unsere Experimente deuten darauf hin, dass CAT-1 auch in dem Microgliamodell N11-Zellen konstitutiv exprimiert wird, Aspirin[®] dennoch die Transkription des Gens herabreguliert.

3.3.3 Reduziert Aspirin[®] die NO-Konzentration durch direktes Wegfangen von NO?

Nach einer Arbeit von Asanuma und Kollegen [8, 2001] ist ein Teil der Reduktion der NO-Produktion in N11-Zellen möglicherweise durch ein direktes Abfangen von NO durch Aspirin[®] verursacht. In dieser Veröffentlichung wurde gezeigt, dass NO, generiert aus dem NO-Donor NOC15 in 250 mM Phosphatpuffer (bei pH 7.6), direkt von NSAIDs weggefangen wird, wenn in ihrer Struktur isolierte Benzolringe auftreten. In der Folge reduziert Aspirin[®] auch den durch den NO-Donor induzierten apoptischen Zelltod in der Neuroblastom-Zelllinie B65. Dass allerdings Aspirin[®], wie die

Autoren behaupten keinen Einfluss auf die Induktion der iNOS hätte, kann aus den gezeigten Bildern immunocytochemischer Experimente nicht einwandfrei geschlossen werden, da diese Aufnahmen sicher nicht quantitativ auswertbar sind. Außerdem muss man kritisch anmerken, dass das vollständige Quenchen des ESR-Signals, indikativ für das Wegfangen des NO durch Aspirin[®], nur für das genannte chemische in vitro-System gezeigt wurde. In einem zellulären System tritt vielleicht weniger freies NO auf, dagegen mehr gebundenes NO, z.B. als Nitroso-Cystein, oder auch das in dieser Arbeit nachgewiesene Nitrat-Anion.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass Aspirin[®] in der Lage sein könnte, auch nach abgeschlossener Induktion der iNOS das von diesem Enzym gebildete NO durch direktes Wegfangen zu reduzieren. Zwar fiel die Reduktion der Nitritkonzentration im Medium geringer aus, wenn Aspirin[®] nicht zugleich mit LPS dem Medium zugesetzt wurde, sondern erst nach sieben oder 20 Stunden. Da die Induktion des NO-produzierenden Proteins durch LPS aber bereits nach wenigen Stunden abgeschlossen sein sollte [114, Schmidlin und Wiesinger 1995], bedeutet die weiter vorhandene Reduktion, dass auch posttranslational die im Medium vorhandene NO-Menge durch Aspirin[®] beeinflusst wird. Ist dies der Fall, muss auch nach einem Wechsel auf Medium ohne Induktor in Gegenwart von Aspirin[®] die Nitritkonzentration abnehmen, wie es ja die Experimente der Abbildung 2.20 zeigen.

Da allerdings auch die Expression des iNOS-Proteins durch Aspirin[®] reduziert wird, ist davon auszugehen, dass sich die beiden Effekte, nämlich eine Beeinflussung des iNOS-Proteins auf Transkriptions-/Translationsebene und eine posttranslationale Reduktion der NO-Menge überlagern. Letzteres kann durch eine direkte chemische Reaktion des Aspirins[®] mit NO verursacht sein. Es sei aber angemerkt, dass die aufgeführten Ergebnisse auch dadurch erklärbar sind, dass Aspirin[®] die iNOS-Aktivität direkt hemmt, so dass dadurch in seiner Gegenwart die NO- und dadurch auch die Nitritkonzentration abnimmt. Eine abschließende Beurteilung kann sicher erst bei Anwendung ausgefeilter Methoden, vielleicht der von Asanuma verwendeten Elektronenspinresonanz in Zellkulturen, versucht werden.

3.4 Wirkung von TGF- β

TGF- β ist ein endogenes Cytokin, von dem bei Säugern drei Isoformen bekannt sind. Es kommt ubiquitär im Körper vor und spielt eine wichtige Rolle bei Wachstums- und Entwicklungsvorgängen, Entzündungsreaktionen und im Immunsystem [131, Vincent et al., 1997] [132, Vodovotz, 1997] [84, McLennan und Koishi, 2002]. TGF- β ist außerdem ein wichtiger negativer Regulator der iNOS in vivo, die Wirkung auf den Argininstoffwechsel wurde aber bisher noch nicht untersucht. Da über die Argininversorgung der iNOS sowohl die NO-Produktion als auch das Produkt der iNOS (NO/O₂⁻; siehe Kap. 1.2.2) gesteuert werden kann, ist es wichtig, die Wirkung von TGF- β auch auf den Argininstoffwechsel zu untersuchen. Außerdem ist nicht geklärt, über welche Mechanismen gesteuert wird, welche Zellen im ZNS die iNOS exprimieren und welche die ASS. Eine Expression von ASS und iNOS von derselben Zellart ist zwar in Reinkulturen häufig zu beobachten, in Glimischkulturen und in vivo werden ASS und iNOS jedoch meist von verschiedenen Zellarten exprimiert [131, Vincent et al., 1997] [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998]. Ein möglicher Regulator in diesem Zusammenhang ist TGF- β . Eine Kolokalisation von ASS und iNOS in Microgliazellen und in Astrocyten wurde dagegen beim Morbus Alzheimer und nach Inkubation von Glimischkulturen mit β -Amyloid beschrieben [51, Heneka et al., 2001] [42, Haas et al., 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurde, an Hand von N11-Zellen, C6-BU-1-Zellen und Astrogliazellen, erstmalig der Einfluss von TGF- β auf die Expression der ASS untersucht und mit dem Einfluss von TGF- β auf die NO-Produktion verglichen.

In der einzigen mir bekannten Veröffentlichung zur Wirkung von TGF- β auf die Expression der ASS wird berichtet, dass in der Aorta von diabetischen Ratten eine Koinduktion von ASS und iNOS stattfindet, die durch TGF- β vermittelt wird [99, Oyadomari et al., 2001]. In dem von Vodovotz, 1997 [132] verfassten Review-Artikel über die Regulation der NO-Produktion durch TGF- β wird dagegen berichtet, dass TGF- β die NO-Produktion im Gefäßsystem und in zahlreichen anderen peripheren Zellarten hemmt. Der inhibitorische Effekt von Astrogliazellen auf die Induktion der iNOS in Microgliazellen wird durch TGF- β vermittelt und auch in reinen Microglia-kulturen inhibiert TGF- β die NO-Produktion [131, Vincent et al., 1997]. Außerdem wurde eine Induktion des Arginintransporters CAT-1 in Gefäßmuskelzellen durch

TGF- β beschrieben [37, Durante et al., 2001].

N11-Zellen In unseren Experimenten wurde in N11-Zellen keine Inhibition der NO-Produktion durch TGF- β gefunden. Die ASS war in N11-Zellen nicht induzierbar, weder durch LPS oder IFN- γ allein, noch durch eine Kombination dieser Substanzen mit TGF- β . Dies steht im Widerspruch zu Experimenten mit primären Microgliazellen, in denen die Induktion der iNOS und damit einhergehend die NO-Produktion in Gegenwart von TGF- β erheblich inhibiert wurden [131, Vincent et al., 1997] [76, Lieb et al., 2003].

C6-BU-1-Zellen In C6-BU-1-Zellen und Astrogliazellen waren auch in unstimulierten Zellen geringe Mengen an ASS-Protein im Western Blot nachweisbar. Die NO-Produktion und die Expression des ASS-Proteins wurden mit einer Kombination von LPS und IFN- γ induziert. TGF- β inhibierte die Induktion der NO-Produktion. Die Induktion der ASS-Expression wurde dagegen erheblich verstärkt. Dieses überraschende Ergebnis steht im Gegensatz zu einer allgemeinen Annahme, dass eine Restriktion des Argininangebots an der Inhibition der NO-Produktion beteiligt sei (siehe Kap. 1.2.2).

Schlussfolgerung In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die ASS eine funktionelle Bedeutung für die NO-Produktion hat [117, Schmidlin und Wiesinger, 1998]. Ein denkbarer Regulationsmechanismus der NO-Produktion wäre deshalb die Restriktion des Argininangebots über eine Herabregulierung der ASS. Nach unseren Ergebnissen trifft diese Annahme jedoch im Falle von TGF- β nicht zu; wir fanden eine *Inhibition* der NO-Produktion bei gleichzeitiger starker *Hochregulation* der ASS. Es wurde allerdings in diesem Fall nicht untersucht, ob die Behandlung mit TGF- β zu einer Reduktion des iNOS-Proteins führt.

Die Tatsache, dass TGF- β die Expression von iNOS und ASS in einer Zellart in entgegengesetzter Richtung beeinflusst, stützt die Vermutung, dass TGF- β die Verteilung von ASS und iNOS zwischen den verschiedenen Zellarten des Gehirns mitbestimmt. Auch zwischen den Zellarten bestehen Unterschiede in der Wirkung von TGF- β . In C6-BU-1-Zellen hemmt TGF- β wahrscheinlich die Induktion der iNOS, verstärkt aber die Expression der ASS. In N11-Zellen hat TGF- β weder Einfluss auf die Expression der iNOS noch auf die Expression der ASS. TGF- β könnte

also das Expressionsmuster von iNOS und ASS in gemischten glialen Primärkulturen nach Stimulation mit LPS mitbestimmen, indem durch TGF- β in Astrocyten die iNOS-Expression gehemmt und die ASS-Expression induziert wird, so dass die ASS von Astrocyten und die iNOS von Microgliazellen exprimiert wird. TGF- β scheint jedoch nicht die Expression der ASS in Microgliazellen in vivo zu beeinflussen. Auch die von Vincent et al., 1997 [131] und Lieb et al., 2003 [76] beschriebene Inhibition der NO-Produktion in Microgliazellen durch TGF- β wird durch unsere Experimente nicht bestätigt.

Eine weitere Funktion von TGF- β könnte sein, das Produkt der iNOS zu bestimmen: Bei Argininmangel produziert die iNOS Superoxid, das mit NO zu Peroxinitrit reagiert. Neben NO selbst könnte auch Peroxinitrit eine Waffe der Immunzellen gegen Pathogene darstellen, es schädigt aber auch die gesunden Zellen und könnte für den Neuronenverlust bei neurodegenerativen Krankheiten verantwortlich sein. Wird nun durch TGF- β die ASS induziert, steht der iNOS ausreichend Arginin zur Verfügung, woraufhin sie NO produziert, das weit weniger toxisch ist als Peroxinitrit. Auf die physiologische Bedeutung der Argininversorgung in Zusammenhang mit Peroxinitrit weisen Experimente hin bei denen gezeigt wurde, dass Peroxinitrit in Astrocyten eine Aktivierung von CAT-1 mit nachfolgender Freisetzung von Arginin bewirkt [129, Vega-Agapito et al., 2002]. Das freigesetzte Arginin kann von anderen Zellen aufgenommen werden und somit einer Unterversorgung der iNOS mit Arginin entgegenwirken.

3.5 N11-Zellen als Microgliamodell zur Untersuchung von iNOS und Argininstoffwechsel

Es war auch Ziel der Arbeit, zu einem Urteil zu kommen, ob die Microgliazelllinie N11 als Modell für primäre Microgliazellen geeignet ist, wenn Aussagen über den NO-Weg und den damit in Zusammenhang stehenden Argininstoffwechsel getroffen werden sollen. N11-Zellen sind leicht zu kultivieren und exprimieren wesentliche Merkmale der Microgliazellen [105, Righi et al., 1989] (siehe Kap. 1.4). Die iNOS ist in diesen Zellen ohne Schwierigkeiten zu induzieren [18, Betz Corradin et al., 1993] (siehe auch diese Arbeit). Die Hemmung der Induktion der iNOS in N11-Zellen durch Aspirin[®] ist mit der Hemmung in primären Microgliazellen zu vergleichen [69, Kim

et al., 1998]. Es stellte sich allerdings im Laufe der vorliegenden Arbeit heraus, dass in wichtigen Punkten Ergebnisse, die mit primären Microgliazellen erhalten worden waren, nicht in N11-Zellen reproduziert werden konnten.

So wurde in Microgliazellen *in vivo* und *in vitro* ASS immunhistochemisch nach Stimulation mit LPS/IFN- γ nachgewiesen [50, Heneka et al., 1999] [66, Kawahara et al., 2001]. In Homogenaten von N11-Zellen war dagegen in Western Blot-Experimenten keine ASS detektierbar, wie schon früher im AK Wiesinger festgestellt worden war [115, Schmidlin, 1996]. Dies mag natürlich auf experimentelle Schwierigkeiten zurückzuführen sein, nämlich dass das verwendete Antiserum im Western Blot das Enzym nicht erkennt. Nichtsdestotrotz eignen sich offenbar die N11-Zellen nicht, die ASS-Expression auf Proteinebene zu untersuchen.

Schwerwiegender ist die Tatsache, dass die NO-Produktion der N11-Zellen nicht durch TGF- β inhibiert wird. Dies steht im Gegensatz zu Literaturberichten, dass primäre Microgliazellen auf Inkubation mit Immunstimulantien und TGF- β mit einer Inhibition der iNOS-Induktion reagieren [76, Lieb et al., 2003] [131, Vincent et al., 1997]. Mag es auch für sich genommen interessant sein, dass die Transformation der Zellen die Inhibierbarkeit eliminiert hat, so ist andererseits die Eignung der N11-Zellen als Modellsystem für Fragestellungen zum NO-Weg in Microgliazellen auf Grund dieser Ergebnisse in Frage zu stellen.

3.6 Die Arginininosuccinat-Lyase wird konstitutiv exprimiert

Neben der ASS wurde auch die Expression der ASL untersucht. Die ASL katalysiert den letzten Schritt im Citrullin-NO-Zyklus: die Reaktion von Argininosuccinat zu Arginin unter Abspaltung von Fumarat. Die Geschwindigkeit der Argininsynthese wird allerdings nicht durch die Aktivität der ASL, sondern durch die Aktivität der ASS bestimmt (Kap. 1.2.1). Es sollte untersucht werden, ob neben der ASS und der iNOS auch die Expression der ASL durch die untersuchten Substanzen beeinflusst wird. Dadurch sollte überprüft werden, ob die ASL konstitutiv exprimiert wird. Im Falle der konstitutiven Expression könnte die ASL als interner Standard zur Kontrolle des Western Blots dienen.

Im gesunden Rattengehirn wird die ASL mit Ausnahme der Oligodendrocyten

von allen Zellen exprimiert [25, Braissant et al., 1999]. Auch in Lunge, Milz und Leber der Ratte wird die ASL konstitutiv exprimiert [90, Nagasaki et al., 1996]. Bei verschiedenen pathologischen Zuständen oder experimentellen Entzündungsmodellen kommt es entweder zu einer geringen Verstärkung oder zu keiner Änderung der Expression [90, Nagasaki et al., 1996] [142, Zhang et al., 1999] [99, Oyadomari et al., 2001].

In unseren Experimenten wurde das ASL-Protein mittels Western Blot in Zellhomogenaten nachgewiesen. ASL-Protein wurde von allen untersuchten Zellarten (N11-Zellen, C6-BU-1-Zellen und Astrocyten) exprimiert, dabei hatte die Behandlung der Zellen mit LPS, IFN- γ , Aspirin[®] oder TGF- β keinen Einfluss auf die im Western Blot nachweisbare Menge an ASL-Protein. Hiermit wurde bestätigt, dass die ASL ein konstitutives Enzym ist und sich daher gut als interner Standard zum Vergleich von Expressionsmustern mittels Western Blot eignet. Dass die ASL, im Gegensatz zur ASS, unter proinflammatorischen Bedingungen nicht hochreguliert wird, zeigt, dass die Aktivität des Citrullin-NO-Zyklus nicht über die Aktivität der ASL reguliert wird.

3.7 Wirkung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

Die Aminogruppen langlebiger Proteine, insbesondere die Lysinreste, können nicht-enzymatisch mit Monosacchariden wie Glucose und Fructose reagieren. Durch nachfolgende Oxidation und Dehydrierung [87, Münch et al., 1997] [46, Haslbeck et al., 2002] entsteht eine heterogene Gruppe von Proteinaggregaten, die sogenannten AGEs. Sie entstehen vor allem in pathologischen Proteinablagerungen wie dem β -Amyloid bei der Alzheimer-Krankheit oder β -2-Microglobulin bei Dialysepatienten. AGEs stehen im Verdacht, in den Alzheimer-Läsionen im Gehirn eine chronische Entzündungsreaktion mit Induktion der iNOS auszulösen oder zu unterhalten [87, Münch et al., 1997] [88, Münch et al., 2003]. An Hand von verschiedenen glialen Zellkulturen sollte nun unter in vitro-Bedingungen geprüft werden, ob AGEs die iNOS induzieren.

In früheren Untersuchungen wurde in den Gehirnen von Alzheimerpatienten eine Kolokalisation von AGEs und iNOS in Astrocyten und in Microgliazellen gefunden

[137, Wong et al., 2001a]. Außerdem lässt sich in der Microgliazelllinie N11 der Maus die NO-Produktion durch die iNOS mit künstlich hergestellten AGEs induzieren [138, Wong et al., 2001b]. Dass AGEs cytotoxisch sind und die Cytotoxizität durch oxidativen Stress vermittelt wird, wurde in einer Untersuchung an Hamsterfibroblasten und menschlichen Neuroblastomzellen gezeigt. Dabei ließ sich die Cytotoxizität der AGEs durch Antioxidantien, Produkte des Citrat-Zyklus und durch den iNOS-Inhibitor Aminoguanidin abschwächen [78, Loske et al., 1998].

In unseren Experimenten wurde als Modell-AGE Serumalbumin eingesetzt, das an den Lysinresten zu Carboxymethyllysin modifiziert war (CML), als Kontrolle diente unmodifiziertes Serumalbumin. CML ist das hauptsächliche AGE in humanem Gewebe und wird sogar als Marker von lang andauerndem oxidativem Stress betrachtet, welcher u.a. bei der Entwicklung der diabetischen Neuropathie eine Rolle spielen mag [112, Schleicher et al., 1997] [46, Haslbeck et al., 2002]. Es wurden zwei unterschiedliche Chargen verwendet (CML-1, CML-2). Durch Inkubation der Zellen mit CML allein ließ sich die NO-Produktion nicht induzieren. Dies ist ein Widerspruch zu früheren Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass AGEs in N11-Zellen die iNOS induzieren [138, Wong et al., 2001b]. Allerdings waren diese AGEs heterogen, da sie durch wochenlange Inkubation von Albumin mit Glucose erzeugt worden waren. Die in dieser Arbeit verwendeten AGEs wurden dagegen durch kurze Reaktion (90 min) von Albumin mit Glyoxylsäure hergestellt [112, Schleicher et al., 1997].

Unter der Vorstellung, dass AGEs möglicherweise mit Immunstimulantien synergistisch die NO-Produktion induzieren, wurde CML mit LPS oder mit IFN- γ kombiniert. Durch Kombination von CML mit LPS wurde die NO-Produktion nicht verstärkt, die Kombination von IFN- γ mit CML-1 führte jedoch zu einer zusätzlichen Induktion der NO-Produktion in N11-Zellen und in gemischten Gliaprimärkulturen. Bei unmodifiziertem Serumalbumin war dieser Effekt nicht vorhanden. In reinen Astrogliazellen konnte kein Einfluss von AGEs auf die NO-Produktion gemessen werden, daraus ist zu schließen, dass in astrogliareichen Primärkulturen der geringe Anteil von Microgliazellen ausschlaggebend für den gemessenen Effekt ist.

CML-2 reduzierte bei Stimulation mit einer niedrigen IFN- γ -Konzentration die Konzentration an Nitrit im Medium in konzentrationsabhängiger Weise. Da CML-2 allerdings nicht einwandfrei charakterisiert war [E. Schleicher persönliche Mitteilung], könnte eine Verunreinigung oder ein Defekt im CML-2 für diesen Effekt ver-

antwortlich sein.

Es sei auf jeden Fall betont, dass hier erste Ergebnisse zu einer komplexen Fragestellung geschildert wurden, die für eine exakte Bearbeitung eine genauere Charakterisierung der AGEs, aber auch weitere Informationen über die Stimulierung von Microgliazellen mit Cytokinen erforderlich machen. Die Experimente mit CML-1 legen die Vermutung nahe, dass eine Verstärkung der durch IFN- γ induzierten NO-Produktion durch CML in vivo zur Pathogenese des Neuronenverlusts beim Morbus Alzheimer beitragen könnte, indem schon eine geringe entzündliche Aktivität mit Ausschüttung kleiner Mengen IFN- γ zu einer überschießenden NO-Produktion führt. Neuronenverlust ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf CML-induzierte Apoptose zurückzuführen, wie z.B. für die Retina gezeigt wurde [103, Reber et al., 2003]. Intervention in der Bildung von AGEs könnte daher durchaus ein neuartiger Therapieansatz bei M. Alzheimer sein.

Kapitel 4

Material und Methoden

4.1 Geräte, Materialien, Chemikalien

Geräte

Blot-Kammer	Mini-Trans-Blot; Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer (vertikal)	Renner, Darmstadt
Elektrophoresekammer (horizontal)	OWL-Systems B1; Peqlab, Erlangen
ELISA-„Reader“	MRX TC Revelation; Dynex Technologies, Denkendorf
Phasenkontrastmikroskop	IM; Zeiss, Oberkochen
Photometer	Spectrophotometer UV-120-01; Shimadzu, Kyoto, Japan und Spektralphotometer Uvikon 860; Kontron, München
Pipettoren, 0.5 μ l – 5 ml	SL-Pette; Süd-Laborbedarf, München; und Finnpipette; Labsystems Oy, Finnland
Spannungsquellen	EPS 500/400; Pharmacia, Freiburg; und 2301 Macrodrive 1; LKB, Schweden
Sterile Werkbank	Lamin Air HLB 2448; Heraeus, Hanau
Thermocycler	Mastercycler Gradient; Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Cell Disruptor B 30; Branson Sonic Power, Danbury, USA
UV-Illuminator	Vilber Lourmat; MJB Fermentas, St. Leon-Roth

Videodokumentationsgerät	CR DS1; Advanced Bio-Solutions, Adelebsen, Göttingen
Zellinkubator	Typ B 5060 EC CO ₂ ; Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Kühlzentrifuge, Centrikon H-401, Kontron, München; Zellzentrifuge, Varifuge K, Heraeus, Hanau; Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg

Materialien

Plastikwaren für die Zellkultur	Nunc, Wiesbaden
Nylonnetz	Scrynell 211 μm und 135 μm Maschenweite; Züricher Beuteltuchfabrik, Rüslikon, Schweiz
Pipettenspitzen	Plastibrand 1000 μl , 200 μl , 10 μl ; Brand, Wertheim
Nitrozellulosefolie	Immobilon-NC Transfer Membranes Millipore, Eschborn
Filterpapier	Rundfilter MN 615; Macherey-Nagel, Düren

Reagenzien für die Zellkultur

DMEM	Gibco, Eggenstein
DMEM ohne Glucose	Biochrom, Berlin
FCS	Roche, Mannheim
Penicillin G, Streptomycinsulfat	Serva, Heidelberg
BUDR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Roche, Mannheim
Sorbitol	E. Merck, Darmstadt

Cytokine und Reagenzien für die Stimulations-Experimente

TGF- β_1 aus Schweineblutplättchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IFN- γ -Maus (rekombinant aus <i>E. coli</i>); IFN- γ -Ratte (rekombinant aus <i>E. coli</i>)	R+D Systems, Wiesbaden
LPS (Serotyp 026:B6 aus <i>E. coli</i>); Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carboxymethyllysin-Albumin und Serumalbumin	Geschenk Prof. E. Schleicher, Tübingen

Reagenzien für den Western Blot, die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und die Proteinbestimmung

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Bio-Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad, München
Chemilumineszens-Substrat	Lumi-Light ^{PLUS} ; Roche, Mannheim
Entwickler	Agfa-Gevaert G 150; lokaler Fotohandel
Filmmaterial	BioMax Light-1; Kodak, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fixierer	Agfa-Gevaert G 330; lokaler Fotohandel
Molekülmassenstandard	Prestained SDS-Page Standards, Low Range; Bio-Rad, München
Positiv-Kontrolle, iNOS	Maus Macrophagenlysate; Transduction Laboratories, Lexington, KY (USA)
Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
Rinder-Serumalbumin	Bio-Rad, München
SDS	Fluka AG, Buchs, Schweiz
TEMED	Serva, Heidelberg

Enzyme und Reagenzien für die RT-PCR und die Agarosegelelektrophorese

Agarose	Seakem LE agarose; Biozym
DNA-Leiter	DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder); Roche, Mannheim; oder peqGOLD 100 bp DNA- Leiter Plus; Peqlab, Erlangen
DNA-Polymerasen	Taq DNA Polymerase; Roche, Mannheim; oder Hot Star Taq Master Mix Kit; QIAGEN, Hilden
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Primer	MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
Reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transkriptase; Gibco, Eggenstein; oder Reverse Transcriptase, M-MuLV; Roche, Mannheim
RNA-Isolierungssystem	E.Z.N.A. Total RNA Midi-Kit; Peqlab, Erlangen

Alle weiteren Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Roche (Mannheim).

4.2 Zellkultur

4.2.1 Lösungen

BUDR-Medium	DMEM + 10% FCS + BUDR $10^{-4} M$
Dialysiertes FCS	100 ml FCS wurden unter sterilen Bedingungen gegen $4 \times 5 l$ 0.9% NaCl dialysiert
DMEM/FCS	DMEM mit 10% FCS
DMEM/FCS/PS	DMEM + 10% FCS + Penicillin 20 IU/ml, Streptomycinsulfat 20 $\mu g/ml$
Gluc/Suc/PS	137 mM NaCl, 58 mM Saccharose, 5.5 mM Glucose, 5.4 mM KCl, 0.22 mM KH_2PO_4 , 0.17 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 330–350 mosmol/l, Penicillin 20 IU/ml, Streptomycinsulfat 20 $\mu g/ml$
PBS	20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4 + 150 mM NaCl
Sorbitolmedium	DMEM ohne Glucose + 10% dialysiertes FCS + 25 mM Sorbitol
Trypsin 0.2%	0.2% Trypsin + 1 mM EDTA
Trypsin 0.05%	0.05% Trypsin

Alle verwendeten Zellen wiesen adhärentes Wachstum auf und wurden in Plastikschaalen oder Plastikkolben kultiviert. Für Zellkulturmedien und Puffer wurde deionisiertes Wasser verwendet, das über eine Seralpur VP50-Anlage (Seral, Ramsbach-Baumbach) nachgereinigt wurde. Alle für die Zellkultur verwendeten Medien waren durch Mitarbeiter des Lehrstuhls I des Physiologisch-Chemischen Instituts auf Kontamination durch Bakterien und Mycoplasmen geprüft worden. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte in einer Atmosphäre von 10 % CO_2 und 90 % Luft bei $37^\circ C$ und 100 % Luftfeuchtigkeit.

4.2.2 Zelllinien

N11-Zellen

Bei den N11-Zellen handelt es sich um eine Microglia-Zelllinie der Maus, die durch retrovirale Transfektion von Primärzellen generiert wurde. Die Zellen exprimieren alle beschriebenen Phänotypenmarker für Microglia und weisen typische Microglia-Eigenschaften wie F_cR-vermittelte Phagozytose und Cytokinproduktion auf [105, Righi et al., 1989]. Die Zellen wurden nach folgender Vorschrift passagiert:

- Das Medium der im Kulturkolben gewachsenen Zellen wurde abgesaugt.
- Die Zellen wurden mit 3 ml Trypsin 0.2% benetzt, und das Trypsin wurde sofort wieder abgesaugt.
- Es wurden 10 ml Trypsin 0.2% in den Kolben pipettiert, und der Kolben wurde ca. 5 min lang in den Brutschrank gestellt. Danach lösten sich die Zellen unter Schwenken des Kolbens ab.
- Die Zellsuspension wurde zusammen mit 30 ml Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min lang bei 4°C und 500 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgesaugt.
- Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium ca. 45 Sekunden lang mit der Glaspipette trituriert, bis eine homogene Suspension vorlag.
- In die Kulturkolben wurde zwischen 0.1 und 1 ml Zellsuspension in ca. 40 ml Medium ausgesät. In die 5 cm-Schalen wurde zwischen 0.05 und 0.5 ml Zellsuspension in 5 ml Medium, in die 9 cm-Schalen zwischen 0.1 und 1 ml in 12 ml Medium ausgesät.

Alle Lösungen wurden vor dem Passagieren im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Als Kulturmedium wurde DMEM/FCS verwendet. Die Zellen wurden dann für die Experimente verwendet, wenn gerade konfluentes Wachstum erreicht worden war. In den 5 cm-Schalen befanden sich dann 6 Millionen Zellen, in den 9 cm-Schalen 20 Millionen Zellen.

C6-BU-1-Zellen

Bei der Zelllinie C6-BU-1 handelt es sich um eine 5-Brom-2'-desoxyuridin (BUDR)-resistente Mutante [3, Amano et al., 1974] der von Benda et al., 1968 [16] beschriebenen Rattengliomzelllinie C6. In unseren Experimenten wurden diese Zellen als Astrocytenmodell verwendet.

Als Kulturmedium wurde BUDR-Medium verwendet. Die Trypsinlösung zum Ablösen der Zellen enthält 0.05% Trypsin und kein EDTA. Ansonsten erfolgte die Passagierung wie bei den N11-Zellen. Bei konfluentem Wachstum befanden sich 4 Millionen Zellen in den 5 cm-Schalen und 13 Millionen Zellen in den 9 cm-Schalen.

4.2.3 Primärkulturen

Astrogliareiche Primärkulturen

Die astrogliareichen Primärkulturen wurden nach Vorschrift von Hamprecht und Löffler, 1985 [44] aus Gehirnen neugeborener NMRI-Mäuse oder Wistar-Ratten angelegt. Alle verwendeten Lösungen und Geräte waren steril und es wurde in einer sterilen Werkbank gearbeitet. Die Kulturen wurden im Alter von 14–21 Tagen für die Experimente verwendet. Für die Präparation wurden vier Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser benötigt (Schalen 1–4). Präparationsmedium war Gluc/Suc/PS. Die Schale 1 enthielt 30 ml, die Schalen 2 und 3 enthielten 20 ml, Schale 4 enthielt 10 ml des Mediums. Die Schalen 2–4 standen auf Eis. In Schale 3 befand sich ein Nylonnetz mit 211 μm Maschenweite, in Schale 4 ein Netz mit 135 μm Maschenweite. Das Präparierbesteck bestand aus einer gebogenen Schere und zwei Pinzetten, die in 70% Ethanol desinfiziert worden waren.

Durchführung:

- Das Tier wurde in Schale 1 gewaschen
- Das Tier wurde durch Dekapitation getötet und das Gehirn durch Druck auf das Hinterhaupt in eine 5 cm-Plastikschale gepreßt.
- Das Gehirn wurde in die Schale 2 überführt, in welcher alle Gehirne eines Wurfes bis zur Weiterverarbeitung gesammelt wurden.
- Die Gehirne wurden in ein Netz mit der Maschenweite 211 μm überführt und durch das Netz in die Schale 3 passiert.

- Die Suspension wurde zweimal mit einer 10 ml-Pipette trituriert und anschließend durch das Netz mit der Maschenweite 135 μm in die Schale 4 passiert.
- Die Suspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 4°C und 500 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgenommen und der Zelniederschlag mit warmem Kulturmedium (DMEM/FCS/PS) mit einer 10 ml-Pipette durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren trituriert.
- Die Zellsuspension wurde in Kulturmedium verdünnt, und zwar 35 ml je Rattenhirn und 25 ml je Mäusehirn. Die Zellsuspension hatte dann eine Dichte von ca. 600 000 lebenden Zellen je ml.
- Je 5 ml wurden in 5 cm-Kulturschalen ausgesät.
- Alle sieben Tage wurde das Medium erneuert.

Sorbitolselektionierte Mausglia-Primärkulturen

Sorbitolselektionierte Glia-Primärkulturen der Maus wurden nach der Vorschrift von Wiesinger et al., 1991 [134] kultiviert. Es handelt sich dabei um reine Astrogliakulturen, da sie nur Zellen enthalten, die die Astrogliamarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) oder Vimentin exprimieren [134, Wiesinger et al., 1991]. Die Kulturen wurden wie oben beschrieben angelegt, allerdings wurde das DMEM/FCS/PS-Medium nach dem siebten Tag durch Sorbitolmedium ersetzt. Bei jedem weiteren Mediumwechsel wurde ebenfalls das Sorbitolmedium verwendet, die Experimente wurden jedoch mit dem normalen, glucosehaltigen Medium durchgeführt.

Subkultivierte Rattenastrogliazellen

Aus astrogliareichen Primärkulturen der Ratte können durch einfaches Passagieren Kulturen erzeugt werden, die zu 100% aus Astrogliazellen bestehen [J. Hullmann, unveröffentlichte Ergebnisse].

Die oben beschriebenen astrogliareichen Primärkulturen (Abschnitt 4.2.3) wurden wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben passagiert; Kulturmedium war DMEM mit 10% FCS, die Trypsinlösung enthielt 0.05% Trypsin. Die Zellen wurden vor ihrer Verwendung für die Experimente ein oder zwei Mal passagiert.

4.3 Stimulationsexperimente

Um die NO-Produktion und die dazu benötigten Enzyme in den Zellen zu induzieren bzw. deren Induktion zu hemmen, wurden dem Medium verschiedene Substanzen zugesetzt. Bei Kombinationen mehrerer Substanzen wurden diese dem Medium in der Regel gleichzeitig zugegeben. Zur Vorbereitung wurde für jede Stimulationsbedingung ein steriles Zentrifugenröhrchen bereitgestellt. Die Röhrchen wurden mit 37°C warmem Stimulationsmedium (DMEM + 1% FCS) gefüllt. Dann wurden die zu untersuchenden Substanzen in den gewünschten Konzentrationen hinzugefügt. Die Zellen wurden aus dem Inkubator geholt, das Medium wurde abgesaugt und durch das vorbereitete Stimulationsmedium ersetzt. Dabei wurden für die 5 cm-Schalen je 2 oder 3 ml und für die 9 cm-Schalen je 5 oder 7 ml verwendet.

Es wurden die Substanzen LPS, IFN- γ , TGF- β , Aspirin[®], Carboxymethyllysin-Albumin und Serumalbumin untersucht. Die Konzentrationen, in denen die Substanzen dem Medium zugesetzt wurden, betragen für LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, für IFN- γ 100 U/ml (falls nicht anders vermerkt) und für TGF- β 1 ng/ml. Die anderen Substanzen wurden je nach Experiment in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

Die Zellen wurden in der Regel über Nacht (ca. 20 h) in den Inkubator gestellt. Danach wurde die Nitritkonzentration im Medium bestimmt, gegebenenfalls wurden die Zellen für den Western Blot oder die RT-PCR weiterverarbeitet.

4.4 Bestimmung der Nitritkonzentration

Das von den Zellen produzierte NO hat eine Halbwertszeit von 6–10 s, es lässt sich also mit einfachen Methoden nicht direkt quantifizieren. Als stabiles Endprodukt entsteht aus NO unter anderem Nitrit, welches im Kulturmedium akkumuliert. Es wird angenommen, daß die Menge an Nitrit proportional zur produzierten NO-Menge ist; somit dient die Nitritkonzentration im Medium als Maß für die NO-Produktion (Tracey, 1992). Die Nachweismethode beruht auf einer von Griess (1879) beschriebenen Reaktion. Dabei wird Sulfanilamid mit HNO_2 diazotiert. Das entstandene Diazoniumsalz koppelt anschließend mit N-(1-Naphthyl)ethyldiamin zu einer gefärbten Azoverbindung, die bei 550 nm ihr Absorptionsmaximum hat.

Griess-Reagenz

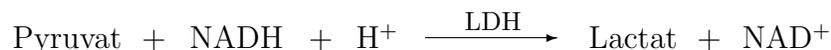
1% Sulfanilamid und 0.1% N-(1-Naphthyl)ethyldiamin in 2.5% Phosphorsäure. Da das fertige Griess-Reagenz sehr instabil ist, wurde es kurz vor der Verwendung aus Stammlösungen hergestellt: 2% Sulfanilamid in 2.5% Phosphorsäure und 0.2% N-(1-Naphthyl)ethyldiamin in 2.5% Phosphorsäure wurden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Durchführung

Es wurden 500 μl Medium aus den Kulturschalen, die zuvor geschwenkt worden waren, abgenommen und mit 500 μl Griess-Reagenz gemischt. Nach 10 min wurde die Extinktion bei 550 nm im Photometer gemessen und die Nitritkonzentration auf einer Eichgeraden abgelesen. Für diese diente als Standard in DMEM gelöstes NaNO_2 in bekannten Konzentrationen.

4.5 Bestimmung der LDH-Aktivität

Um auszuschließen, daß die Effekte von Aspirin[®] auf toxischer Zellschädigung beruhen, wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium und im Zelllysat bestimmt. Im Falle einer Zellschädigung würde vermehrt LDH aus dem Intrazellularraum ins Medium übertreten. Die Aktivitätsmessung beruht auf folgender von der LDH katalysierten Reaktion:



Da NADH beim Übergang zu NAD^+ sein Lichtabsorptionsverhalten ändert, kann die LDH-Aktivität über die Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm bestimmt werden. Die Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme ist proportional zur Enzymaktivität. Es müssen sowohl die LDH-Aktivität im Kulturmedium als auch die gesamte zelluläre LDH-Aktivität ermittelt werden.

4.5.1 Lösungen

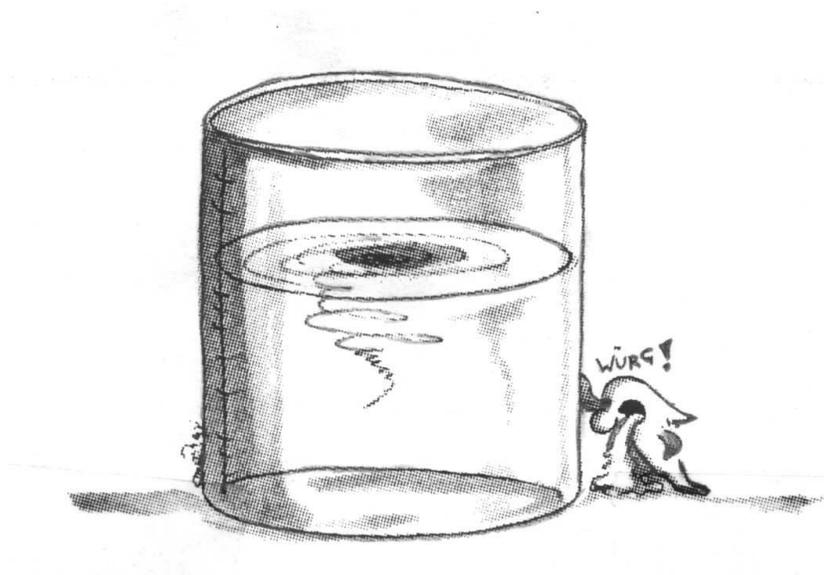
Reaktionspuffer	80 mM TRIS, 200 mM NaCl, pH 7.2
Reaktionsmix	8 μl 10 mM NADH, 40 μl 16 mM Pyruvat, 152 μl Reaktionspuffer

4.5.2 Durchführung

Die verwendeten Zellen wurden in 5 cm-Schalen kultiviert. Je Schale wurden 500 μl Medium abgenommen und auf Eis gestellt. Bei den N11-Zellen wurde das Medium 2 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um die wenigen abgelösten Zellen, die im Medium enthalten waren, zu entfernen. Die bei dieser Prozedur durch Lyse der Zellen freigesetzte LDH-Aktivität war dabei so gering, daß sie keinen Einfluß auf das Ergebnis hatte.

Zur Ermittlung der gesamten zellulären LDH-Aktivität wurde das restliche Medium abgesaugt, in jede Schale wurden 2 ml Stimulationsmedium + 1% Triton-X-100 gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde durch Umschwenken der Schalen vermischt, 500 μl davon wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches dann auf Eis gestellt wurde.

Zur Messung der Absorption wurden in den Näpfen einer 96-Loch-Platte 10 μl Probe (Lysat oder Kulturmedium) mit 170 μl Reaktionspuffer und 180 μl Reaktionsmix gemischt. Unmittelbar danach wurde im ELISA-„Reader“ 10 min lang alle 30 s die Extinktion bei 340 nm gemessen und aus der Geschwindigkeit des Extinktionsabfalls die LDH-Aktivität berechnet.



RÜHRFISCH

4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

4.6.1 Lösungen

BAB	30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid in H ₂ O
Elektrodenpuffer	25 mM TRIS/HCl, pH 8.4, 192 mM Glycin, 0.1% SDS
Probenpuffer	62.5 mM TRIS/HCl, pH 8.6, 10% Glycerin, 5% SDS, 0.002% Bromphenolblau
Lysepuffer 1	30 mM TRIS/HCl + 1% Triton X-100
Lysepuffer 2	300 mM NaCl, 50 mM TRIS, pH 7.5, 1% Triton X-100, Leupeptin 1 μ M, Aprotinin 0.3 μ M, Pepstatin 1 μ M, PMSF 1 mM (die Proteaseinhibitoren werden kurz vor Verwendung des Puffers hinzugegeben)
Sammelgelpuffer	0.5 M TRIS/HCl, pH 6.8
Trenngelpuffer	3 M TRIS/HCl, pH 8.9
Transferpuffer	125 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH ca. 8.6; der Puffer wird als 5 \times konz. Stammlösung ohne Methanol gelagert und kurz vor der Verwendung verdünnt.
Waschpuffer	PBS, 0.05% Tween 20

4.6.2 Probengewinnung (Protokoll 1)

- Die Zellen (kultiviert in 9 cm-Schalen) wurden aus dem Inkubator genommen und 1 \times mit warmem PBS gewaschen.
- Die Zellen wurden mit 700 μ l eiskaltem Lysepuffer 1 benetzt und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei 4°C in den Kühlschrank gestellt (2–12 min lang).
- Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber abgekratzt und mit einer Pipette in einen Homogenisator nach Potter-Elvehjem (Braun, Melsungen) überführt.
- Die Lysate wurden ca. 45 s lang mechanisch zerkleinert.
- Anschließend wurden die Proben 5 min lang in der Tischzentrifuge bei 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert.

- Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 4.6.4).
- Zum Teil wurden die Proben bis zur Verwendung für die Gelelektrophorese bei -20°C aufbewahrt.
- Unmittelbar vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit Probenpuffer und Mercaptoethanol vermischt ($20\ \mu\text{l}$ Probe + $10\ \mu\text{l}$ Probenpuffer + $5\ \mu\text{l}$ Mercaptoethanol), 4 min lang gekocht und auf Eis abgekühlt.

4.6.3 Probengewinnung (Protokoll 2)

- Die Zellen (kultiviert in 9 cm-Schalen) wurden aus dem Inkubator genommen und $1\times$ mit warmem PBS gewaschen.
- Die Zellen wurden mit $500\ \mu\text{l}$ eiskaltem Lysepuffer 2 benetzt und bis zu ihrer Weiterverarbeitung auf Eis gestellt (2–6 min lang).
- Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber abgekratzt und mit einer Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
- Die Lysate wurden 5–10 s im Ultraschallgerät bei Stufe 6 mechanisch zerkleinert.
- Anschließend wurden die Proben 5 min lang in der Tischzentrifuge bei 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 4.6.4).
- Danach wurden die Proben nach folgendem Schema mit Probenpuffer und Mercaptoethanol vermischt:

$$\text{Probe} : \text{Probenpuffer} : \text{Mercaptoethanol} = 4 : 2 : 1$$

Zum Teil wurden die Proben in dieser Mischung bei -20°C bis zu ihrer Verwendung für die Gelelektrophorese aufbewahrt.

- Unmittelbar vor der Gelelektrophorese wurden die Proben 4 min lang im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

4.6.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden von jeder Probe zwei Messansätze gemessen und anschließend wurde der Mittelwert aus beiden Ergebnissen errechnet.

Das Bradford-Reagenz wurde kurz vor der Verwendung mit Wasser verdünnt (1 Teil Bradford-Reagenz + 6 Teile Wasser). 900 μl des verdünnten Bradford-Reagenz wurden mit 100–x μl Wasser und, je nach erwarteter Proteinkonzentration, mit x = 0.5–5 μl Probe gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt, für die als Standard Rinderserumalbumin in bekannten Konzentrationen diente.

4.6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden mit Gelen einer Größe von 7 \times 8 cm und einer Dicke von 1 mm durchgeführt. Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 3%, das Trenngel von 7.5%.

Die Polyacrylamidgele wurden nach folgendem Schema hergestellt:

(SG: Sammelgel; TG: Trenngel; APS: Ammoniumperoxodisulfat)

	7.5% TG	3% SG
BAB	1.50 ml	0.50 ml
TG-Puffer	3.00 ml	-----
SG-Puffer	-----	2.50 ml
H ₂ O	0.68 ml	1.69 ml
----- 5 min entgasen -----		
10% SDS	60 μl	60 μl
TEMED	10 μl	10 μl
10% APS	250 μl	250 μl

Nach ca. einer halben Stunde wurde der Kamm aus dem Sammelgel entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Elektrodenpuffer gefüllt und die Proben wurden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Es wurden zwischen 30 und 120 μg Protein je Tasche aufgetragen. Die Proteinmenge je Tasche war bei zu vergleichenden Proben immer gleich. Die Proben wurden 2.5 h bei konstanter Spannung von 70 V und ca. 30 mA aufgetrennt.

4.6.6 Blotting

Die Proteine wurden in einer Blot-Kammer, die mit Transferpuffer gefüllt war, nach Vorschrift des Herstellers vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 25 V und ca. 100 mA Stromstärke über Nacht (iNOS), oder bei einer Spannung von 100 V und ca. 360 mA Stromstärke eine Stunde lang (ASS/ASL) durchgeführt. Wegen der hohen Stromstärke wurde beim letzteren Verfahren mit einem Eisblock gekühlt.

4.6.7 Anfärbung

Die Anfärbung wurde in einer Plastikschaale durchgeführt. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran nacheinander mit folgenden Lösungen unter leichtem Schütteln inkubiert:

- ASS/ASL

- 3 × 5 min Waschpuffer
- Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver über Nacht
- 3 × 5 min Waschpuffer
- 2 h anti-ASS-Antiserum (Verdünnung 1 : 250) und anti-ASL-Antiserum (Verdünnung 1 : 250) gemeinsam in Waschpuffer
- 3 × 5 min Waschpuffer
- 1 h anti-Kaninchen-IgG-Antiserum, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, in Waschpuffer (Verdünnung 1 : 1000)
- 3 × 10 min Waschpuffer

Die Membran wurde mit 10 ml Waschpuffer, 2 ml Chlornaphtol und 4 μ l H₂O₂ inkubiert, nach wenigen Sekunden wurden die Banden sichtbar. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt. Mit einer Videokamera, die an einen Computer angeschlossen war, wurden digitale Bilder der Membran aufgenommen, welche dann auf Diskette gespeichert wurden.

- iNOS

- 1 h Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver
- 1 × 5 min Waschpuffer
- 3.5 h anti-iNOS-Antiserum in Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver (Verdünnung 1 : 500)
- 3 × 5 min Waschpuffer
- 1 h anti-Maus-IgG-Antiserum, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, in Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver (Verdünnung 1 : 30 000)
- 3 × 5 min Waschpuffer

Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie verpackt und mit 800 μ l Lumi-Light-Lösung 5 min inkubiert. Die Lumi-Light-Lösung wurde entfernt, die Membran neu verpackt und in einer Belichtungskassette direkt auf einen Film aufgelegt. Nach 1–10 min Exposition wurde der Film entwickelt.

Antikörper:

- Anti-ASS-Antiserum vom Kaninchen, Labor Dr. Wiesinger [116, Schmidlin et. al., 1997]
- Anti-ASL-Antiserum vom Kaninchen, Labor Dr. Wiesinger [23, T. Bolla und H. Wiesinger, unveröffentlicht]
- Anti-iNOS-Antiserum, Isotyp: Maus-IgG 2a; Transduction Laboratories, Lexington, KY (USA)
- Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum, mit Peroxidase konjugiert; Jackson Immuno-Research Lab., West Groove, PA (USA)
- Anti-Maus-IgG-Antiserum, mit Peroxidase konjugiert; Geschenk, Frau Dr. M. Witte, Chirurgische Klinik, Universität Tübingen

4.7 RT-PCR und Agarosegelelektrophorese

4.7.1 Lösungen

Ethidiumbromidlösung	0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ in H_2O
Probenpuffer (5 \times)	16 μl gesättigte wässrige Lösung von Bromphenolblau 80 μl 500 mM EDTA, pH 8.0 200 μl TAE-Puffer 50 \times mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 ml auffüllen

4.7.2 RNA-Isolierung

Um die Kontamination mit RNase so gering wie möglich zu halten, wurde mit Einmalhandschuhen gearbeitet, es wurden nur fabrikneue Pipettenspitzen und Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Bidestilliertes Wasser wurde nach Vorschrift mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt.

Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die in 9 cm-Schalen kultiviert wurden. Es wurde ein kommerziell erhältliches System verwendet, dabei wurde nach der Vorschrift des Herstellers verfahren. Anschließend wurden die Proben bis zu acht Wochen bei -20°C gelagert, bevor sie für die Reverse Transkription verwendet wurden.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Kontamination mit Protein wurden 3 μl Probe mit 9 μl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und es wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus der Extinktion bei 260 nm wurde mit der Formel $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ RNA die RNA-Konzentration berechnet. Der Quotient $E_{260} : E_{280}$ diente als Maß für die Kontamination mit Protein, er betrug zwischen 1.9 und 2.0. Damit war die Präparation weitestgehend proteinfrei.

4.7.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit zwei unterschiedlichen Reversen Transkriptasen durchgeführt:

ASS: M-MLV Reverse Transkriptase; Gibco, Eggenstein

CAT 1/CAT 2A: Reverse Transcriptase, M-MuLV; Roche, Mannheim

Es wurden die mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet und 1.3 μg Gesamt-RNA je Reaktionsansatz eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten:

ASS:	CAT 1/CAT 2A:
50 mM Tris-HCl (pH 8.3)	50 mM Tris-HCl (pH 8.3)
75 mM KCl	40 mM KCl
10 mM Dithiothreitol	10 mM Dithiothreitol
3 mM MgCl_2	6 mM MgCl_2
0.5 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP	1 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
oligo (dT) ₁₅ , 40 mA ₂₆₀ -Einheiten	oligo (dT) ₁₅ , 40 mA ₂₆₀ -Einheiten
1.3 μg Gesamt-RNA	1.3 μg Gesamt-RNA
200 Einheiten M-MLV RT	40 Einheiten M-MuLV RT
Gesamtvolumen: 20 μl	Gesamtvolumen: 20 μl

Die auf Eis gekühlten Lösungen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und eine Stunde lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde entweder unmittelbar im Anschluss an die Reverse Transkription für die PCR verwendet oder bei -20°C für spätere PCRs aufbewahrt.

4.7.4 Polymerase-Kettenreaktion

Nach der Reversen Transkription erfolgte die Amplifikation der cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion. Sie wurde mit zwei unterschiedlichen DNA Polymerasen durchgeführt:

ASS: Taq DNA Polymerase; Roche, Mannheim

CAT 1/CAT 2A: Hot Star Taq Master Mix Kit; QIAGEN, Hilden

Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Die Reaktionsansätze enthielten:

ASS:	CAT 1/CAT 2A:
10 mM Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM Tris-HCl
1.5 mM MgCl ₂	1.5 mM MgCl ₂
50 mM KCl	50 mM KCl
0.2 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0.2 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
0.5 μM Primer 1	0.5 μM Primer 1
0.5 μM Primer 2	0.5 μM Primer 2
2.5 U Taq DNA Polymerase	2.5 U HotStar Taq DNA Polymerase
3 μl cDNA aus 4.7.3	2 μl cDNA aus 4.7.3
Gesamtvolumen: 100 μl	Gesamtvolumen: 25 μl

Die auf Eis gekühlten Lösungen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, im Thermocycler nach folgendem Schema inkubiert und anschließend für die Agarosegelelektrophorese verwendet:

ASS: Denaturierung 2 min 94°C

Denaturierung	1 min 94°C	30×
Primer-Hybridisierung	1 min 50°C	
Polymerisation	1 min 75°C	

Endpolymerisation 10 min 75°C

CAT 1/CAT 2A: Aktivierung der DNA Polymerase 15 min 94°C

Denaturierung	1 min 94°C	24×
Primer-Hybridisierung	1 min 53°C	
Polymerisation	1 min 72°C	

Endpolymerisation 10 min 72°C

Primersequenzen:

Maus-ASS-Primer:	sense: 5'-GCC GAA ATG ATC TGA TGG AGT-3'
	antisense: 5'-ACC TGT GTA TAC GAG CTC TGC-3'
Maus-CAT 1-Primer:	sense: 5'-CGG TAG CCG AGA AGT TTT CTC-3'
	antisense: 5'-CAC TGG TCC AAG TTG CTG TCA-3'

Maus-CAT 2A-Primer: sense: 5'-GGG TTC TAT GTT CCC CTT ACC-3'
antisense: 5'-GGT AAG AAC GGG ACC ATG AAG-3'

4.7.5 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit Gelen von 10 cm × 9 cm Größe, 0.5 cm Dicke und einer Agarosekonzentration von 1.2% durchgeführt.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde die Agarose durch Kochen in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 65°C abgekühlt war, wurde sie in die Elektrophoresekammer gegossen und der Kamm wurde eingesteckt. Nach 30 min wurde die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt und der Kamm entfernt. Es wurden je 15 µl Probe mit 3 µl Probenpuffer gemischt, in die Geltaschen pipettiert und 1.5 Stunden lang bei einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt.

Zur Anfärbung der DNA wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromidlösung inkubiert und anschließend 20 min in Wasser entfärbt. Das Ergebnis wurde unter UV-Bestrahlung mit einer Videokamera, die an einen Computer angeschlossen war, dokumentiert.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen verstärkt exprimiert und steht im Verdacht, an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt zu sein. Da Arginin der iNOS als Substrat dient, steht die induzierte NO-Produktion in engem Zusammenhang mit dem Argininstoffwechsel. In der vorliegenden Arbeit wurden in Modellsystemen für Microgliazellen (N11-Zellen) und für Astrocyten (C6-BU-1-Zellen) Aspekte der induzierten Produktion von NO und des Argininstoffwechsels unter dem Einfluss möglicher therapeutischer und endogener Modulatoren untersucht. Die NO-Produktion wurde durch Inkubation der kultivierten Zellen mit den Immunstimulantien Lipopolysaccharid (LPS) und/oder Interferon- γ (IFN- γ) induziert. Ursache ist die Induktion des iNOS-Proteins, wie im Western Blot auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Die NO-Produktion wurde über das im Kulturmedium nachgewiesene Nitrat quantifiziert. Änderungen der Proteinexpression wurden durch Western Blot, Änderungen in mRNAs durch RT-PCR nachgewiesen. Mit Aspirin[®] und TGF- β wurden zwei Substanzen eingesetzt, die die NO-Produktion hemmen. Mit CML als Modellsubstanz für sogenannte advanced glycation endproducts (AGEs), Reaktionsprodukte langlebiger Proteine mit Glucoseresten, wurde ein potentieller Induktor der NO-Produktion untersucht.

Es wurde gezeigt, dass Aspirin[®] in N11-Zellen die Induktion der NO-Produktion und die Induktion des iNOS-Proteins durch Immunstimulantien hemmt. Allerdings wird die Reduktion der gemessenen Nitritkonzentration im Überstand kultivierter N11-Zellen möglicherweise neben einer Beeinflussung der Transkription/Translation zusätzlich durch eine direkte Beeinflussung der iNOS-Aktivität oder durch das Wegfangen des gebildeten NOs hervorgerufen. Auch in C6-BU-1-Zellen hemmt Aspirin[®]

die Induktion der NO-Produktion. Bei der Untersuchung der Wirkung von Aspirin[®] auf den Argininstoffwechsel zeigte sich, dass die durch Immunstimulantien induzierte Expression der Argininosuccinat-Synthetase (ASS) in C6-BU-1-Zellen durch Aspirin[®] gehemmt wird. In N11-Zellen war in unseren Experimenten kein ASS-Protein nachweisbar. In N11-Zellen wurde zusätzlich die Expression der Arginintransporter CAT-1 und CAT-2A auf mRNA-Ebene untersucht. Während CAT-2A-mRNA erst nach Inkubation der Zellen mit Immunstimulantien nachweisbar war, wurde CAT-1 auch von unstimulierten Zellen exprimiert. Immunstimulantien verstärkten die Expression von CAT-1. Die Hochregulation der Expression durch Immunstimulantien wurde sowohl bei CAT-1 als auch bei CAT-2A durch Aspirin[®] vermindert. Aspirin[®] inhibiert also nicht nur die Induktion des iNOS-Proteins, sondern auch die Induktion von für die Argininversorgung der iNOS wesentlichen Enzymen und Transportern. Die Minderversorgung der iNOS mit Arginin könnte somit zur Inhibition der NO-Produktion durch Aspirin[®] beitragen.

Während Aspirin[®] sowohl die NO-Produktion als auch die Enzyme und Transporter, die vermutlich die Versorgung der iNOS mit Arginin sicherstellen, herabreguliert, zeigt sich bei TGF- β ein anderes Bild. In N11-Zellen hat TGF- β keinen Effekt auf die NO-Produktion. In C6-BU-1-Zellen hemmt TGF- β die Induktion der NO-Produktion durch Immunstimulantien, die durch Immunstimulantien induzierte Expression des ASS-Proteins wird jedoch durch TGF- β noch weiter verstärkt. Letzteres wurde in primären Astrogliazellen bestätigt. Die Regulation der Argininversorgung der iNOS ist also unter physiologischen Bedingungen nicht einfach als Regulationsmechanismus der NO-Produktion zu verstehen, sondern hat möglicherweise weitere Funktionen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die iNOS bei Argininmangel nicht NO, sondern Superoxid produziert, welches mit auch nur in kleinsten Mengen vorhandenem NO zu Peroxynitrit reagiert. Peroxynitrit ist eine stark cytotoxische Substanz. TGF- β könnte also über die Induktion der ASS das Argininangebot verbessern und so das Produkt der iNOS bestimmen bzw. einem Argininmangel mit daraus resultierender Peroxynitritbildung vorbeugen.

Es wurde desweiteren die Induktion des Argininosuccinatlyase-Proteins (ASL) untersucht. Die ASL wird im Allgemeinen als konstitutiv exprimiertes Enzym angesehen. Auch in unseren Experimenten hatte keine der untersuchten Substanzen einen Einfluss auf das Expressionsniveau des ASL-Proteins. Daher eignet sich die ASL für

die Verwendung als interner Standard bei Proteinnachweisen z.B. im Western Blot.

Mit Carboxymethyllysine-Albumin (CML) wurde eine Modellschubstanz für advanced glycation endproducts (AGEs) untersucht. In gemischten Glia-Primärkulturen und in N11-Zellen verstärkte CML bei einem Teil der Experimente die durch IFN- γ induzierte NO-Produktion. Zur Beantwortung der Frage ob es sich hierbei um reproduzierbare Ergebnisse handelt, sind weitere Experimente notwendig. Bei Induktion der NO-Produktion durch LPS wurde kein Einfluss von CML auf die NO-Produktion gefunden.

Literaturverzeichnis

- [1] Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G., 2001. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem. J.* 357, 593–615.
- [2] Aloisi F., 2001. *Immune function of microglia*. *Glia* 36, 165–179.
- [3] Amano T., Hamprecht B., Kemper W., 1974. *High activity of choline acetyltransferase induced in neuroblastoma × glioma hybrid cells*. *Exp. Cell Res.* 85, 399–408.
- [4] Amin A.R., Vyas P., Attur M., Leszczynska-Piziak J., Patel I.R., Weissmann G., Abramson B., 1995. *The mode of action of aspirin-like drugs: Effect on inducible nitric oxide synthase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7926–7930.
- [5] Anthony J.C., Breitner J.C.S., Zandi P.P., Meyer M.R., Jurasova I., Norton M.C., Stone S.V., 2000. *Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists. The Cache County Study*. *Neurology* 54, 2066–2071.
- [6] Arimoto T., Bing G., 2003. *Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration*. *Neurobiol. Dis.* 12, 35–45.
- [7] Arnt-Ramos L.R., O'Brien W.E., Vincent S.R., 1992. *Immunohistochemical localization of argininosuccinate synthase in the rat brain in relation to nitric oxide synthase-containing neurons*. *Neuroscience* 51, 773–789.
- [8] Asanuma M., Nishibayashi-Asanuma S., Miyazaki I., Kohno M., Ogawa N., 2001. *Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals*. *J. Neurochem.* 76, 1895–1904.
- [9] Baltrons M.A., Pedraza C., Sardon T., Navarra M., Garcia A., 2003. *Regulation of NO-dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells*. *Toxicol. Lett.* 139, 191–198.
- [10] Barres B.A., 1991. *New roles for glia*. *J. Neurosci.* 11, 3685–3694.
- [11] Barron K.D., 1995. *The microglial cell. A historical review*. *J. Neurol. Sci.* 134 Suppl., 57–68.
- [12] Barron K.D., 2003. *Microglia: history, cytology, and reactions*. *J. Neurol. Sci.* 207, 98.

- [13] Baumann N., Pham-Dinh D., 2001. *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian nervous system*. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.
- [14] Baydoun A.R., Wileman S.M., Wheeler-Jones C.P., Marber M.S., Mann G.E., Pearson J.D., Closs E.I., 1999. *Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells*. *Biochem. J.* 344, 265–272.
- [15] Beckman J.S., Koppenol W.H., 1996. *Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly*. *Am. J. Physiol.* 271, 1424–1437.
- [16] Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L., Sweet W., 1968. *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. *Science* 161, 370–371.
- [17] Bennett M.R., 1997. *Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on*. *Prog. Neurobiol.* 52, 159–195.
- [18] Betz Corradin S., Mauël J., Donini S.D., Quattrocchi E., Ricciardi-Castagnoli P., 1993. *Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells*. *Glia* 7, 255–262.
- [19] Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., 1997. *Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 118, 925–937.
- [20] Böttner M., Kriegelstein K., Unsicker K., 2000. *The transforming growth factor- β s: structure, signalling and roles in the nervous system development and functions*. *J. Neurochem.* 75, 2227–2240.
- [21] Bogle R.G., Baydoun A.R., Pearson J.D., Moncada S., Mann G.E., 1992. *L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide*. *Biochem. J.* 284, 15–18.
- [22] Boissel J.P., Zelenka M., Godtel-Armbrust U., Feuerstein T.J., Ulrich F., 2003. *Transcription of different exons 1 of the human neuronal nitric oxide synthase gene is dynamically regulated in a cell- and stimulus-specific manner*. *Biol. Chem.* 384, 351–362.
- [23] Bolla T. und Wiesinger H., unveröffentlicht.
- [24] Bon C.L., Garthwaite J., 2003. *On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation*. *J. Neurosci.* 23, 1941–1948.
- [25] Braissant O., Gotoh T., Loup M., Mori M., Bachmann C., 1999. *L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 70, 231–241.
- [26] Broe G.A., Grayson D.A., Creasey H.M., Waite L.M., Casey B.J., Bennett H.P., Brooks W.S., Halliday G.M., 2000. *Anti-inflammatory drugs protect against Alzheimer Disease at low doses*. *Arch. Neurol.* 57, 1586–1591.

- [27] Brune K., Neubert A., 2001. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of the ideal COX-2 inhibitor: a pharmacologist's perspective*. Clin. Exp. Rheumatol. 19 (6 Suppl. 25), 51–57.
- [28] Butterfield D.A., Griffin S., Münch G., Pasinetti G.M., 2002. *Amyloid beta-peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists*. J. Alzheimers Dis. 4, 193–201.
- [29] Cabral G.A., Harmon K.N., Carlisle S.J., 2001. *Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation*. Adv. Exp. Med. Biol. 493, 207–214.
- [30] Castegna A., Thongboonkerd V., Klein J.B., Lynn B., Markesbery W.R., Butterfield D.A., 2003. *Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain*. J. Neurochem. 85, 1394–1401.
- [31] Catania M.V., Giuffrida R., Seminara G., Barbagalla G., Aronica E., Gorter J.A., Dell'Albani P., Ravagna A., Calabrese V., Giuffrida-Stelle A.M., 2003. *Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in in vitro stellate astrocytes and in vivo reactive astrocytes after electrically induced status epilepticus*. Neurochem. Res. 28, 607–615.
- [32] Chen L., Kepka-Lenhart D., Wright T.M., Morris S.M. Jr., 1999. *Salicylate-enhanced activation of transcription factors induced by interferon- γ* . Biochem. J. 342, 503–507.
- [33] Closs, E.I., Lyons C.R., Kelly C., Cunningham J.M., 1993. *Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of domain that determines the transport properties of the MCAT proteins*. J. Biol. Chem. 268, 20796–20800.
- [34] Closs E.I., Scheld J., Sharafi M., Förstermann U., 2000. *Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: Role of cationic amino acid transporters*. Mol. Pharmacol. 57, 68–74.
- [35] Closs E.I., 2002. *Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 11, 99–107.
- [36] Du Z.Y., Li X.Y., 1999. *Inhibitory effects of indomethacin on interleukin-1 and nitric oxide production in rat microglia in vitro*. Int. J. Immunopharmacol. 21, 219–225.
- [37] Durante W., Liao L., Reyna S.V., Peyton K.J., Schafer A.I., 2001. *Transforming growth factor- β_1 stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells*. Circulation 103, 1121–1127.
- [38] Egberongbe Y.I., Gentleman S.M., Falkai P., Bogerts B., Polak J.M., Roberts G.W., 1994. *The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain*. Neurosci. 59, 561–578.

- [39] Fiebich B.L., Lieb K., Kammerer N., Hill M., 2003. *Synergistic inhibitory effect of ascorbic acid and acetylsalicylic acid on prostaglandin E₂ release in primary rat microglia*. J. Neurochem. 86, 173–178.
- [40] Flam B.R., Hartmann P.J., Harrell-Booth M., Solomonson L.P., Eichler D.C., 2001. *Caveolar localisation of arginine regeneration enzymes, argininosuccinate synthase, and lyase, with endothelial nitric oxide synthase*. Nitric Oxide 5, 187–197.
- [41] Friebe A., Koesling D., 2003. *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Circ. Res. 93, 96–105.
- [42] Haas J., Storch-Hagenlocher B., Biessmann A., Wildemann B., 2002. *Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate synthase: co-induction in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with beta-amyloid 1-42 in vitro*. Neurosci. Lett. 322, 121–125.
- [43] Hammermann R., Dreißig M.D., Mössner J., Fuhrmann M., Berrino L., Göthert M., Racké K., 2000. *Nuclear factor- κ B mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages*. Mol. Pharmacol. 58, 1294–1302.
- [44] Hamprecht B., Löffler F., 1985. *Primary glial cultures as a model for studying hormone action*. Meth. Enzymol. 109, 341–345.
- [45] Hansson E., Rönnbäck L., 2003. *Glial neuronal signalling in the central nervous system*. FASEB J. 17, 341–348.
- [46] Haslbeck K.M., Schleicher E.D., Friess U., Kirchner A., Neundörfer B., Heuss D., 2002. *N^c-Carboxymethyllysine in diabetic polyneuropathies*. Acta Neuropathol. 104, 45–52.
- [47] Hattori Y., Campbell E.B., Gross S.S., 1994. *Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle cells. Role in the regeneration of arginine for nitric oxide synthesis*. J. Biol. Chem. 269, 9405–9408.
- [48] Hattori Y., Kasai K., Gross S.S., 1999. *Cationic amino acid transporter gene expression in cultured vascular smooth muscle cells and in rats*. Am. J. Physiol. 276, 2020–2028.
- [49] Heales S.J.R., Bolaños J.P., Stewart V.C., Brookes P.S., Land J.M., Clark J.B., 1999. *Nitric oxide, mitochondria and neurological disease*. Biochim. Biophys. Acta 1410, 215–228.
- [50] Heneka M.T., Schmidlin A., Wiesinger H., 1999. *Induction of argininosuccinate synthetase in rat brain glial cells after striatal microinjection of immunostimulants*. J. Cerebr. Blood Flow Metab. 19, 898–907.

- [51] Heneka M.T., Wiesinger H., Dumitrescu-Ozimek L., Riederer P., Feinstein D. L., Klockgether T., 2001. *Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 60, 906-916.
- [52] Hölscher C., 1997. *Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity*. Trends Neurosci. 20, 298–303.
- [53] Hu J., Akama K.T., Krafft G.A., Chromby B.A., Van Eldik L.J., 1998. *Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release*. Brain Res. 785, 195–206.
- [54] Huang C., Stevens B.R., Nielsen R.B., Slovin P.N., Fang X., Nelson D.R., Skimming J.W., 2002. *Interleukin-10 inhibitor of nitric oxide biosynthesis involves suppression of CAT-2 transkription*. Nitric Oxide 6, 79–84.
- [55] Hukkanen M., Platts L.A., Haralambous S., Ainola M., Konttinen Y.T., Kollias G., Polak J.M., 2003. *Induction of inducible nitric oxide synthase, argininosuccinate synthase and GTP cyclohydrolase I in arthritic joints of human tumor necrosis factor-alpha transgenic mice*. J. Rheumatol. 30, 652–659.
- [56] Husson A., Brasse-Lagnel C., Fairand A., Renouf S., Lavoigne A., 2003. *Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle*. Eur. J. Biochem. 270, 1887–1899.
- [57] Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C., 1999. *Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 43, 879–886.
- [58] Ignarro L.J., 2002. *Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview*. J. Physiol. Pharmacol. 53, 503–514.
- [59] Jakovljevic V., Banic B., Radunovic A., 1991. *The effect of aluminium chloride upon the transition of drugs through the blood-brain barrier into the central nervous system*. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 16, 171–175.
- [60] Jellinger K.A., 1999. *What is new in degenerative dementia disorders?* Wien. Klin. Wochenschr. 111, 682–704.
- [61] Kakuda D.K., Sweet M.J., MacLeod C.L., Hume D.A., Markovich D., 1999. *CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages*. Biochem. J. 340, 549–553.
- [62] Kalla R., Bohatschek M., Kloss C.U.A., Krol J., von Maltzan X., Raivich G., 2003. *Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: Involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase and G_i-protein systems*. Glia 41, 50–63.

- [63] Katsuyama K., Shichiri M., Kato H., Imai T., Marumo F., Hirata Y., 1999. *Differential inhibitory actions by glucocorticoid and aspirin on cytokine-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells*. *Endocrinology* 140, 2183–2190.
- [64] Kaur C., Hao A.J., Wu C.H., Ling E.A., 2001. *Origin of microglia*. *Microsc. Res. Tech.* 54, 2–9.
- [65] Kavanaugh M.P., Wang H., Zhang Z., Zhang W., Wu Y.N., Dechant E., North R.A., Kabat D., 1994. *Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family*. *J. Biol. Chem.* 269, 15445–15450.
- [66] Kawahara K., Gotoh T., Oyadomari S., Kajizono M., Kuniyasu A., Ohsawa K., Imai Y., Kohsaka S., Nakayama H., Mori M., 2001. *Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells*. *Mol. Brain Res.* 90, 165–173.
- [67] Kepka-Lenhart D., Chen L., Morris S.M. Jr., 1996. *Novel actions of aspirin and sodium salicylate: discordant effects on nitric oxide synthase mRNA in a murine macrophage cell line*. *J. Leukoc. Biol.* 59, 840–846.
- [68] Kiemer A.K., Vollmar A.M., 2001. *Induction of L-arginine transport is inhibited by atrial natriuretic peptide: A peptide hormone as a novel regulator of inducible nitric-oxide synthase substrate availability*. *Mol. Pharmacol.* 60, 421–426.
- [69] Kim H.M., Lee E.H., Shin T.K., Chung C.K., An N.H., 1998. *Inhibition of the induction of the inducible nitric oxide synthase in murine brain microglial cells by sodium salicylate*. *Immunology* 95, 389–394.
- [70] Koga T., Koshiyama Y., Gotoh T., Yonemura N., Hirata A., Tanihara H., Negi A., Mori M., 2002. *Coinduction of nitric oxide synthase and arginine metabolic enzymes in endotoxin-induced uveitis rats*. *Exp. Eye Res.* 75, 659–667.
- [71] Koga T., Zhang W.Y., Gotoh T., Oyadomari S., Tanihara H., Mori M., 2003. *Induction of citrulline-nitric oxide (NO) cycle enzymes and NO production in immunostimulated rat RPE-J cells*. *Exp. Eye Res.* 76, 15–21.
- [72] Kröncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V., 1995. *Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 327–343.
- [73] Kröncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V., 1998. *Inducible nitric oxide synthase in human diseases*. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 147–156.
- [74] Kuffler S.W., Nicholls J.G., 1966. *The physiology of neuroglial cells*. *Ergeb. Physiol.* 57, 1–90.

- [75] Leonhardt H., 1985. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. S. 233–241, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [76] Lieb K., Engels S., Fiebich B.L., 2003. *Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells*. *Neurochem. Int.* 42, 131–137.
- [77] Ling E.A., Wong W.C., 1993. *The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts*. *Glia* 7, 9–18.
- [78] Loske C., Neumann A., Cunningham A.M., Nichol K., Schinzel R., Riederer P., Münch G., 1998. *Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress*. *J. Neural. Transm.* 105, 1005–1015.
- [79] Mangoura D., Sakellaridis N., Jones J., Vernadakis A., 1989. *Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture*. *Neurochem. Res.* 14, 941–947.
- [80] Manner C.K., Nicholson B., MacLeod C.L., 2003. *CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO-production in astrocytes*. *J. Neurochem.* 85, 476–482.
- [81] Marletta M.A., 1994. *Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis*. *Cell* 78:927–930.
- [82] Mayer B., Hemmens B., 1997. *Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells*. *Trends Biochem. Sci.* 22, 477–481.
- [83] McDonald K.K., Zharikov S., Block E.R., Kilberg M.S., 1997. *A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the „arginine paradox“*. *J. Biol. Chem.* 272, 31213–31216.
- [84] McLennan I.S., Koishi K., 2002. *The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells*. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 559–567.
- [85] Morris S.M., 2000. *Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis*. *Nitric Oxide*, 187–197.
- [86] Mossner J., Hammermann R., Racké K., 2001. *Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine*. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 297–305.
- [87] Münch G., Thome J., Foley P., Schinzel R., Riederer P., 1997. *Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease*. *Brain Res. Rev.* 23, 134–143.
- [88] Münch G., Apelt J., Kientsch-Engel R., Stahl P., Lüth H.J., Schliebs R., 2003. *Advanced glycation endproducts and pro-inflammatory cytokines in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology*. *J. Neurochem.* 86, 283–289.

- [89] Murphy S., 2000. *Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS*. *Glia* 29, 1–14.
- [90] Nagasaki A., Gotoh T., Takeya M., Yu Y., Takiguchi M., Matsuzaki H., Takatsuki K., Mori M., 1996. *Coinduction of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase in lipopolysaccharide-treated rats*. *J. Biol. Chem.* 271, 2658–2662.
- [91] Nakamura H., Saheki T., Ichiki H., Nakata K., Nakagawa S., 1991. *Immunocytochemical localization of argininosuccinate synthetase in the rat brain*. *J. Comp. Neurol.* 312, 652–679.
- [92] Napoli C., 2002. *Nitric oxide and atherosclerotic lesion progression: an overview*. *J. Card. Surg.* 17, 355–362.
- [93] Nicholson B., Manner C.K., Kleeman J., MacLeod C.L., 2001. *Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2*. *J. Biol. Chem.* 276, 15881–15885.
- [94] Nicholson B., Manner C.K., MacLeod C.L., 2002. *Cat2 L-arginine transporter-deficient fibroblasts can sustain nitric oxide production*. *Nitric Oxide* 7, 236–243.
- [95] Noack H., Possel H., Chatterjee S., Keilhoff G., Wolf G., 2000. *Nitrosative stress in primary glial cultures after induction of the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS)*. *Toxicology* 148, 133–142.
- [96] Nussler A.K., Billiar T.R., Liu Z.Z., Morris S.M. Jr., 1994. *Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production*. *J. Biol. Chem.* 269, 1257–1261.
- [97] Nussler A.K., Liu Z.Z., Hatakeyama K., Geller D.A., Billiar T.R., Morris S.M. Jr., 1996. *A cohort of supporting metabolic enzymes is coinduced with nitric oxide synthase in human tumor cell lines*. *Cancer Lett.* 103, 79–84.
- [98] Ogawa O., Umegaki H., Hayashi T., Nakamura A., Thakur N.K., Yoshimura J., Endo H., Iguchi A., 2000. *Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression by indomethacin or ibuprofen in beta-amyloid-protein-stimulated J774 cells*. *Eur. J. Pharmacol.* 408, 137–141.
- [99] Oyadomari S., Gotoh T., Aoyagi K., Araki E., Shichiri M., Mori M., 2001. *Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats*. *Nitric Oxide* 5, 252–260.
- [100] Posch K., Schmidt K., Graier W.F., 1999. *Selective stimulation of L-arginine uptake contributes to shear stress-induced formation of nitric oxide*. *Life Sci.* 64, 663–670.

- [101] Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H., Rosen G.M., 1992. *Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase*. J. Biol. Chem. 267, 24173–24176.
- [102] Quan N, Mhlanga J.D., Whiteside M.B., Kristensson K., Herkenham M., 2000. *Chronic sodium salicylate treatment exacerbates brain neurodegeneration in rats infected with Trypanosoma brucei*. Neuroscience 96, 181–194.
- [103] Reber F., Geffarth R., Kasper M., Reichenbach A., Schleicher E.D., Sieg A., Funk R.H., 2003. *Graded sensitiveness of the various neuron populations on the glyoxal-mediated formation of advanced glycation end products and ways of protection*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 241, 213–225.
- [104] Reichenbach A., Robinson S.R., 1995. *Ependymoglia and ependymoglia-like cells*. in: Neuroglia, Hrsg.: H. Kettenmann, B.R. Ransom. Oxford University Press, pp. 58–84.
- [105] Righi M., Mori L., De Libero G., Sironi M., Biondi A., Mantovani A., Donini S.D., Ricciardi-Castagnoli P., 1989. *Monokine production by microglial cell clones*. Eur. J. Immunol. 19, 1443–1448.
- [106] Rogers J., Webster S., Lue L.F., Brachova L., Civin W.H., Emmerling M., Shivers B., Walker D., McGeer P., 1996. *Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis*. Neurobiol. Aging 17, 681–686.
- [107] Rozenfeld C., Martinez R., Figueiredo R.T., Bozza M.T., Lima F.R., Pires A.L., Silva P.M., Bonomo A., Lannes-Vieira J., De Souza W., Moura-Neto V., 2003. *Soluble factors released by toxoplasma gondii-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration*. Infect. Immun. 71, 2047–2057.
- [108] Rubin L.L., Staddon J.M., 1999. *The cell biology of the blood-brain barrier*. Annu. Rev. Neurosci. 22, 11–28.
- [109] Sakitani K., Kitade H., Inoue K., Kamiyama Y., Nishizawa M., Okumura T., Ito S., 1997. *The anti-inflammatory drug sodium salicylate inhibits nitric oxide formation induced by interleukin-1 β at a translational step, but not at a transcriptional step, in hepatocytes*. Hepatology 25, 416–420.
- [110] Sanchez de Miguel L., De Frutos T., Gonzales-Fernandes F., Del Pozo V., Lahoz C., Jimenez A., Rico L., Garcia R., Aceituno E., Millas I., Gomez J., Farre J., Casado S., Lopez-Farre A., 1999. *Aspirin inhibits inducible nitric oxide synthase expression and tumor necrosis factor-alpha release by cultured smooth muscle cells*. Eur. J. Clin. Invest. 29, 93–99.
- [111] Santambrogio L., Belyanskaya S.L., Fischer F.R., Cipriani B., Brosnan C.F., Ricciardi-Castagnoli P., Stern L.J., Strominger J.L., Riese R., 2001. *Developmental plasticity of CNS microglia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 6295–6300.

- [112] Schleicher E.D., Wagner E., Nerlich A.G., 1997. *Increased accumulation of the glycoxidation product N^ε-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging.* J. Clin. Invest. 99, 457–468.
- [113] Schmidlin A., Wiesinger H., 1994. *Transport of L-arginine in cultured glial cells.* Glia 11, 262–268.
- [114] Schmidlin A., Wiesinger H., 1995. *Stimulation of nitric oxide production by lipopolysaccharide is mediated by different signaling pathways in astrocytes.* J. Neurochem. 65, 590–594.
- [115] Schmidlin A., 1996. *Die Bedeutung der Argininversorgung für die NO-Synthese in glialen Zellkulturen. Transportstudien, immunologische und biochemische Untersuchungen.* Dissertation, Universität Tübingen.
- [116] Schmidlin A., Kalbacher H., Wiesinger H., 1997. *Presence of argininosuccinate synthetase in glial cells as revealed by peptide-specific antisera.* Biol. Chem. 378, 47–50.
- [117] Schmidlin A., Wiesinger H., 1998. *Argininosuccinate synthetase: localization in astrocytes and role in the production of glial nitric oxide.* Glia 24, 428–436.
- [118] Schmidlin A., Fischer S., Wiesinger H., 2000. *Transport of L-citrullin in neural cell cultures.* Dev. Neurosci. 22, 393–398.
- [119] Schulz J.B., Matthews R.T., Beal M.F., 1995. *Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases.* Curr. Opin. Neurol. 8, 480–486.
- [120] Shimpo M., Ikeda U., Maeda Y., Ohya K., Murakami Y., Shimada K., 2000. *Effects of aspirin-like drugs on nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells.* Hypertension 35, 1085–1091.
- [121] Simmons W.W., Closs E.I., Cunningham J.M., Smith T.W., Kelly R.A., 1996. *Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes.* J. Biol. Chem. 271, 11694–11702.
- [122] Solomonson L.P., Flam B.R., Pendleton L.C., Goodwin B.L., Eichler D.C., 2003. *The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells.* J. Exp. Biol. 206, 2083–2087.
- [123] Somjen G.G., 1979. *Extracellular potassium in the mammalian central nervous system.* Annu. Rev. Physiol. 41, 159–177.
- [124] Stevens B.R., Kakuda D.K., Yu K., Waters M., Vo C.B., Raizada M.K., 1996. *Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes.* J. Biol. Chem. 271, 24017–24022.
- [125] Stewart V.C., Heales S.J., 2003. *Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration.* Free Radic. Biol. Med. 34, 287–303.

- [126] Stewart W.F., Kawas C., Corrada M., Metter E.J., 1997. *Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use*. *Neurology* 48, 626–632.
- [127] Takeda A., Yasuda T., Miyata T., Goto Y., Wakai M., Watanabe M., Yasuda Y., Horie K., Inagaki T., Doyu M., Maeda K., Subue G., 1998. *Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain*. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 95, 555–558.
- [128] Thiemermann C., 1997. *Nitric oxide and septic shock*. *Gen. Pharmacol.* 29, 159–166.
- [129] Vega-Agapito V., Almeida A., Hatzoglou M., Bolaños J.P., 2002. *Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system y^+ in glial cells*. *J. Biol. Chem.* 277, 29753–29759.
- [130] Verleysdonk S., 1994. *Herstellung homogener astroglialer Zellkulturen aus Rattenhirn durch Mangelmedium und deren Charakterisierung*. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- [131] Vincent V.A.M., Tilders F.J.H., Van Dam A.-M., 1997. *Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: A role for Transforming Growth Factor β* . *Glia* 19, 190–198.
- [132] Vodovotz Y., 1997. *Control of nitric oxide production by transforming growth factor- β -1: Mechanistic insights and potential relevance for human disease*. *Nitric Oxide* 1, 3–17.
- [133] Wang Z., Li D., Liang Y., Wang D., Cai N., 2002. *Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release*. *Acta Pharmacol. Sin.* 23, 974–980.
- [134] Wiesinger H., Schuricht B., Hamprecht B., 1991. *Replacement of glucose by sorbitol in growth medium causes selection of astroglial cells from heterogeneous primary cultures derived from newborn mouse brain*. *Brain Res.* 550, 69–76.
- [135] Wiesinger H., 2001. *Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system*. *Progr. Neurobiol.* 64, 365–391.
- [136] Witte M.B., Barbul A., 2002. *Role of nitric oxide in wound repair*. *Am. J., Surg.* 183, 406–412.
- [137] Wong A., Lüth H., Deuther-Conrad W., Dukic-Stefanovic S., Gasic-Milenkovic J., Arendt T., Münch G., 2001a. *Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease*. *Brain Res.* 920, 32–40.
- [138] Wong A., Dukic-Stefanovic S., Gasic-Milenkovic J., Schinzel R., Wiesinger H., Riederer P., Münch G., 2001b. *Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation endproducts in murine microglia*. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1961–1967.

- [139] Wu D.C., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D.K., Ischiropoulos H., Przedborski S., 2002. *Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinsons disease*. J. Neurosci. 22, 1763–1771.
- [140] Xia Y., Zweier J.L., 1997. *Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6954–6958.
- [141] Xie Z., Wei M., Morgan T.E., Fabrizio P, Han D., Finch C.E., Longo V.D., 2002. *Peroxyntirite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide 1-42 and lipopolysaccharide-activated microglia*. J. Neurosci. 22, 3484–3492.
- [142] Zhang W.Y., Takiguchi M., Koshiyama Y., Gotoh T., Nagasaki A., Iwase K., Yamamoto K., Takeshima H., Negi A., Mori M., 1999. *Expression of citrulline-nitric oxide cycle in lipopolysaccharide- and cytokine-stimulated rat astrogloma C6 cells*. Brain Res. 849, 78–84.
- [143] Zhang W.Y., Gotoh T., Oyadomari S., Mori M., 2000. *Coinduction of inducible nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in cytokine-stimulated PC12 cells and high output production of nitric oxide*. Brain Res. Mol. Brain Res. 83, 1–8.

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Heinrich Wiesinger erstellt. Vor der medizinischen Fakultät wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. Jörg Schulz vertreten, dem ich hierfür herzlich danke.

Prof. Wiesinger danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. Insbesondere möchte ich mich bei ihm herzlich für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken. Die Zusammenarbeit mit ihm war mir eine Freude und wird mir unvergesslich bleiben.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die grosse Hilfsbereitschaft, wenn Fragen und Probleme auftauchten. Insbesondere möchte ich mich bei Johannes Hirrlinger für die Hilfestellung bei der Durchführung der RT-PCR und bei Stefan Verleysdonk für die Unterweisung in der Chemilumineszenzdetektion beim Western Blot bedanken.

Priv. Doz. Dr. Ralf Dringen danke ich für die Unterstützung bei der Messung der LDH-Aktivität.

Die Experimente, die über die Möglichkeit eines direkten Wegfangens von NO durch Aspirin[®] Aufschluss geben sollten, wurden nach meinen Vorstellungen im Labor von Prof. Wiesinger durch Frau Katharina Rehn durchgeführt. Bei Frau Rehn möchte ich mich herzlich für diese Unterstützung bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Julia Hullmann und Christina Schneider für die moralische Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Danken möchte ich auch meinen beiden Computerexperten Benjamin und Matthias Fischmann die rund um die Uhr Lösungen für meine Probleme fanden.

Bei Frau Priv. Doz. Dr. Maria Witte möchte ich mich für die entscheidenden Tipps beim iNOS-Western Blot bedanken.

Prof. Dr. Erwin Schleicher, Medizinische Klinik, Universität Tübingen, danke ich für die Überlassung der AGEs.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglichten und die stets für mich da waren.

Lebenslauf

persönliche Daten: Boris Fischmann

geboren am 18.12.1975 in Calw

Schullaufbahn: 1982–1986 Gottlieb-Rühle-Grundschule Mössingen

1986–1995 Quenstedt-Gymnasium Mössingen

Zivildienst: Juli 1995 – Oktober 1996 im Mutter-Kind-Kurhaus

Dünenheim des DRK auf Langeoog

Hochschulbildung: Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität

Tübingen: Physikum — 25.08.1998

1. Staatsexamen — 31.08.1999

2. Staatsexamen — 05.04.2002

3. Staatsexamen — 07.11.2003

Beruf: AiP in der Urologie im städtischen Krankenhaus

Friedrichshafen 01.01.2004–31.12.2005

Assistenzarzt in der Chirurgie im Zollernalb

Klinikum Albstadt seit 01.02.2005