

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Lokalisation der Arginase im Gehirn der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Berger
aus Magdeburg

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (englisch)	1
Zusammenfassung	2
Abkürzungen	3
1. Einleitung	6
1.1. <i>Polyamine - Hintergründe</i>	6
1.2. <i>Arginin und Arginase in der Polyaminsynthese</i>	11
1.3. <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	15
2. Material und Methoden	17
2.1. <i>Allgemeine Materialien</i>	17
2.1.1. Chemikalien	17
2.1.2. Proteine, Enzyme, Kits	19
2.1.3. Antikörper	20
2.1.4. Geräte und Hilfsmaterialien	20
2.2. <i>Ratten</i>	22
2.3. <i>Herstellung und Aufreinigung des anti-Arg1-Antikörpers</i>	22
2.3.1. Entfernung von IgM-Immunglobulinen	23
2.3.2. Präabsorption von anti-ARG1-Superdex-Pool mit GST-Fusionsprotein	23
2.3.3. Präabsorption des vorgereinigten Serums mit 6HisTR-Agmatinase	23
2.3.4. Affinitätsreinigung der Antikörper	24
2.3.5. Aufkonzentration des anti-Arg1-Antikörpers über SP-Sepharose	24
2.3.6. Auftrennung des pan-Arginase-Serums von Arg1- und Arg2-reaktiven Anteilen	25
2.4. <i>Charakterisierung des Antikörpers</i>	25
2.4.1. Detektion der spezifischen Antikörper im ELISA	25
2.4.2. Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA)	27
2.4.3. Western Blot	27
2.5. <i>Immunzytochemie</i>	30
2.5.1. Perfusions-Fixierung von Rattengehirnen	30
2.5.2. Beschichtung von Objektträgern	31
2.5.3. Immunzytochemie im lichtmikroskopischen Bereich	31
2.5.4. Färbung mit Kresylviolett	32
2.5.5. Immunzytochemie im elektronenmikroskopischen Bereich	33
2.5.6. Immunfluoreszenz-Zytochemie	35
2.5.7. Expression von Arg1 in HeLa-Zellen	36

3. Ergebnisse	37
3.1. Gewinnung eines spezifischen Antikörpers gegen Arginase 1	37
3.1.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen	37
3.1.2. Entfernung der IgM Antikörper durch Gelfiltration	38
3.1.3. Affinitätsreinigung der Antikörper	38
3.1.4. ELISA zur Testung der Kreuzreaktivität	38
3.2. Charakterisierung des gereinigten Antikörpers	40
3.2.1. Kompetitiver ELISA	40
3.2.2. Western-Blot-Analysen	42
3.2.3. Immunzytochemie an transfizierten Zellen	44
3.2.4. Charakterisierung des anti-Arg1-Antikörpers durch Immunzytochemie an Arginase-reichen Geweben	44
3.2.5. Negativkontrollen an immunzytochemisch gefärbten Schnitten	45
3.3. Regionale und zelluläre Verteilung der Arginase im Rattengehirn	49
3.4. Expression der Arginase im Vorderhirn der Ratte	51
3.4.1. Starkes Arginase-Immunsignal in Interneuronen und CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus	51
3.4.2. Deutliche Expression der Arginase in Interneuronen des Cortex cerebri laminae II und III	52
3.4.3. Basalganglien - Arginase markiert differenziertes Neuropil	52
3.4.4. Arginase-Verteilung in diencephalen Strukturen	53
3.4.5. Sind die punktförmigen Muster in Mitochondrien lokalisiert?	53
3.5. Gewinnung eines spezifischen anti-Arg1-Antikörpers und eines Antikörpers mit angereicherter Arginase 2-Immunreaktivität	61
4. Diskussion	65
4.1. Herstellung eines Arginase 1/ pan-Arginase-Antikörpers	65
4.2. Spezifität des Antikörpers	67
4.3. Breite Verteilung der Arginase im Rattengehirn	69
4.3.1. Arginase-Expression in Interneuronen und CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus	70
4.3.2. Arginase-Expression in Interneuronen der Laminae II und III des Cortex cerebri	75
4.4. Arginase - wo ist die vermeintliche Schaltstelle der Polyaminsynthese im Rattengehirn lokalisiert oder die Frage nach der Relevanz beider Polyaminsynthesewege?	76
Literaturverzeichnis	80
Eidesstattliche Versicherung	95

Lebenslauf	97
Publikationen	99
Danksagung	100

Zusammenfassung (englisch)

Polyamines, namely spermidine and spermine, are important regulators of basic cell functions which are also involved with specific functions in the mammalian brain. Accordingly, polyamines as well as the enzymes for polyamine synthesis and degradation are differentially distributed in neurons and glial cells in the respective brain areas. The precursor of spermidine/spermine synthesis, the diamine putrescine, can be synthesised via two different pathways, referred to as the "classical" and the "alternative" pathway. While in the classical pathway urea and carbon dioxide are removed from the amino acid arginine catalysed by arginase and ornithine decarboxylase, yielding putrescine, the alternative pathway, by first removing carbon dioxide by arginine decarboxylase and then urea by agmatinase, may also supply the precursor for spermidine/spermine synthesis.

To examine the expression pattern of arginase in the rat brain, in this study a polyclonal monospecific antibody was characterized by purification of a raw serum raised against arginase 1. Using the purified antibody, the expression of arginase was analysed in cerebral cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, mesencephalon, metencephalon and in the basal ganglia at a cellular and subcellular level. In contrast to other polyamine metabolic enzymes, such as the downstream enzymes agmatinase and spermidine synthase, the pathway entry enzymes arginase and arginine decarboxylase are clearly more widely distributed in rat brain neurons. In order to evaluate the significance of either the classical or the alternative pathway for polyamine synthesis in rat brain, the resulting labeling patterns for arginase were compared with those for agmatinase, spermidine synthase and arginine decarboxylase. With regard to the observed distribution patterns, it seems likely that the synthesis of agmatine rather than putrescine may be the main purpose of the alternative pathway of polyamine synthesis. By contrast, spermidine/spermine synthesis may mainly be fueled by the classical pathway.

Zusammenfassung

Polyamine, insbesondere Spermidin und Spermin, sind wichtige Regulatoren grundlegender Zellfunktionen, die darüber hinaus spezifische Funktionen im Gehirn von Säugtieren erfüllen. Dementsprechend sind Polyamine sowie deren Synthese- und Abbauenzyme in Neuronen und Gliazellen in den jeweiligen Gehirnarealen unterschiedlich verteilt. Der Vorläufer für die Spermidin/Spermin-Synthese, das Diamin Putrescin, kann über zwei unterschiedliche Reaktionswege synthetisiert werden: den „klassischen“ und den „alternativen“ Polyaminstoffwechselweg. Während auf dem klassischen Weg Putrescin durch Abspaltung von Harnstoff und Kohlendioxid, katalysiert durch Arginase und Ornithindecaboxylase, entsteht, kann der Vorläufer der Spermidin/Spermin-Synthese auf dem alternativen Weg, nach Abspaltung von zunächst CO₂ durch Arginindecaboxylase und nachfolgend Harnstoff durch Agmatinase, gebildet werden.

Um das Expressionsmuster von Arginase im Gehirn der Ratte zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein polyklonaler, monospezifischer Antikörper durch Aufreinigung eines gegen Arginase 1 gerichteten Rohserums charakterisiert. Mit Hilfe des gereinigten Antikörpers wurde dann die Expression der Arginase im Cortex cerebri, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Mesencephalon, Metencephalon und in den Basalganglien auf zellulärer und subzellulärer Ebene analysiert. Im Gegensatz zu anderen Enzymen des Polyaminstoffwechsels, wie z.B. der nachgeschalteten Enzyme Agmatinase und Spermidinsynthase, sind die vorgeschalteten Enzyme Arginase und Arginindecaboxylase in den Neuronen des Rattenhirns deutlich weiter verbreitet. Um Rückschlüsse auf die Bedeutung der verschiedenen Wege der Polyaminsynthese im Gehirn der Ratte ziehen zu können, wurden die Verteilungsmuster der Arginase mit denen von Agmatinase, Spermidinsynthase und Arginindecaboxylase verglichen. Die beobachteten Verteilungsmuster deuten darauf hin, dass der alternative Syntheseweg wahrscheinlich primär der Bildung von Agmatin und nicht Putrescin dient. Dagegen dürfte die Synthese von Spermidin/Spermin vermutlich hauptsächlich über den klassischen Weg erfolgen.

Abkürzungen

6HisTR	N-terminaler sechs Histidin Schwanz mit Thioredoxin
6HisTR-Arg1	Thioredoxin-Arginase 1 (pET-Expressionssystem)
AcbC	Nuclues accumbens
ADC	Arginindecarboxylase
AGM	Agmatinase
Arg1	Arginase 1
Arg2	Arginase 2
bidest.	bidestilliert
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CA 1-3	Cornu ammonis 1-3
Calb	Calbindin
CAT-1	kationische Aminosäuretransporter
Cc	Corpus callosum
cDNA	komplementäre (<i>engl. complementary</i>) DNA
CPu	Caudate Putamen = Striatum
Cy2	Cyaninfarbstoff, max. Adsorption / Anregung 492 nm
Cy3	Cyaninfarbstoff, max. Adsorption / Anregung 550 nm
D3V	dorsaler dritter Ventrikel
DAB	3,3'-diaminobenzidintetrahydrochlorid
DDSA	dodecanyl succinic anhydride (Dodecanylbernsteinsäureanhydrid)
DFMO	Difluoromethylornithin
DG	Gyrus dentatus
DMP30	2,4,6-tris dimethylaminomethyl-phenol
dSAM	decarboxyliertes S-Adenosyl-Methionin
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EWP	ELISA-Waschpuffer
Gef	Gefäß
GST	Gluthation-S-Transferase
GST-Arg1	GST-Arginase 1 (pGEX-Expressionssystem)

HCL	Salzsäure
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks Zervixkarzinom-Zellen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IL-4 und IL-10	Interleukin 4 und Interleukin 10
kDa	kilo-Dalton
Kö	Körnerschicht
LGP	lateraler (externer) Globus pallidus
LH	laterale hypothalamische Region
LHb	laterale Habenula
MGP	medialer (interner) Globus pallidus
MHb	mediale Habenula
Mol	Molekularschicht
MTA	Methyl-Thioadenosin
Ncl./Ncll.	Nucleus/Nuclei
ne	nicht erhoben
NGS	normal goat serum (normales Ziegenserum)
NHS	normal horse serum (normales Pferdeserum)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
ODC	Ornithindecaboxylase
ox	Chiasma opticum
Parv	Parvalbumin
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-A	PBS mit Rinderserumalbumin
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pET 32b(+)	Vektor des 6His-Thioredoxin Expressionssystems
pGEX-4T-1	Vektor des Glutathion-S-Transferase (GST) Expressionssystems
Pur	Purkinjzellschicht
PVP	Nucleus paraventricularis thalami
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-PCR

SAMDC	S-Adenosyl-Methionin Decarboxylase
SAMS	S-Adenosyl-Methionin Synthetase
SCh	Ncl. suprachiasmaticus
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHP-1	Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1; Src = Tyrosinkinase Src = c-Src aus cellular und sarcoma)
sm	Stria medullaris
SO	Ncl. supraopticus
SpdS	Spermidinsynthase
SpmS	Sperminsynthase
Str.or.	Stratum oriens
Str.pyr.	Stratum pyramidale
Str.rad.	Stratum radiatum
TBS	tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
Th-Zellen	T-Helferzellen
V	Vene
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Polyamine - Hintergründe

Polyamine sind kleine organische, polykationische Moleküle mit mehreren Amino- bzw. Iminogruppen. Sie sind ubiquitär sowohl in Pro- als auch in Eukaryontenzellen vorhanden. Bei Säugetieren sind Putrescin, Spermidin und Spermin vertreten (Abb. 1). Eukaryontenzellen beinhalten im Gegensatz zu Prokaryonten einen hohen Anteil Spermidin und Spermin und weniger Putrescin (Pegg, 2009).

Die Entdeckung der Polyamine geht auf das Jahr 1678 zurück, als Antonie van Leeuwenhoek Sperminkristalle aus menschlicher Samenflüssigkeit isolierte (van Leeuwenhoek, 1678), woraus später die Bezeichnungen für Spermidin und Spermin abgeleitet wurden. Die chemische Struktur dieser Kristalle wurde dagegen erst 1924 aufgeklärt (Dudley, 1924). Weitere zwei Jahre später wurde dann Spermin auch chemisch synthetisiert (Dudley, 1926). Der Name Putrescin leitet sich dagegen von seiner Bildung durch bakterielle Zersetzung auf verfaulendem Fleisch ab (Wallace, et al. 2003).

In Eukaryontenzellen werden Polyamine aus der Aminosäure Arginin über das Zwischenprodukt Ornithin synthetisiert. Die anschließende Decarboxylierung von Ornithin durch Ornithindecaboxylase (ODC) führt zur Bildung von Putrescin. Dieses wird durch das zweimalige Anknüpfen von Aminopropylresten aus decarboxyliertem S-Adenosyl-Methionin (dSAM) durch die Aminopropyltransferasen Spermidinsynthase (SpdS) und Sperminsynthase (SpmS) zu den drei- bzw. vierfach positiv geladenen Derivaten Spermidin und Spermin verlängert (Abb. 2) (Wallace, et al. 2003).

Die ODC wird häufig fälschlicherweise als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Polyaminsynthese beschrieben. Sie ist zwar der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Synthese von Putrescin, aber die Zufuhr des Aminopropyl-Donors (dSAM) beeinflusst ebenso die Umwandlung von Putrescin in die höheren Polyamine (Pegg, 2009). Zudem kann Putrescin aus Arginin auch über den alternativen Stoffwechselweg über das Zwischenprodukt Agmatin gebildet werden (Abb. 2).

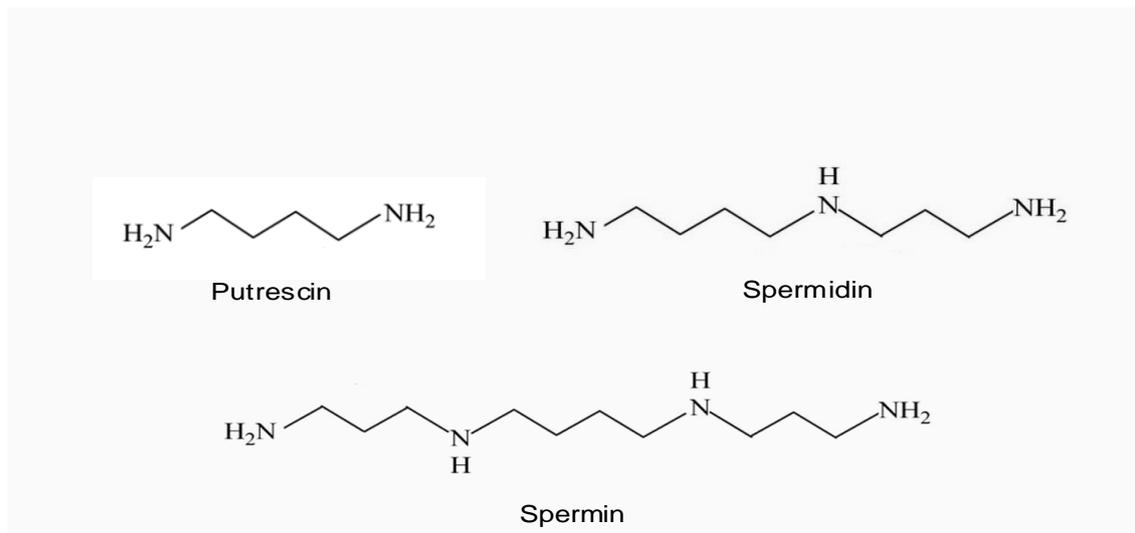
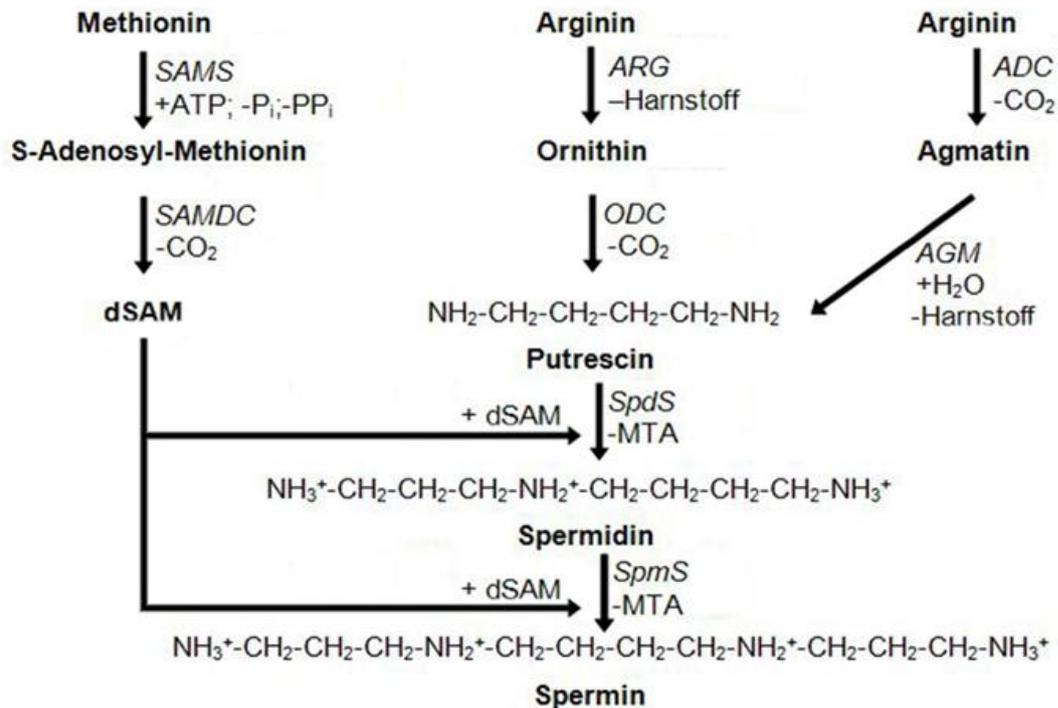


Abb. 1 : Strukturformeln der Polyamine

Funktionen der Polyamine

Die biologischen Funktionen von Polyaminen sind vielfältig (Pegg, 2009). Die phylogenetisch ursprüngliche Aufgabe der Polyamine dürfte ihre ladungsbedingte Interaktion mit negativ geladenen Nucleinsäuren, Proteinen und Phospholipid-Membranen sein (Pegg, 1988; Childs et al., 2003; Sarkar et al., 2009). In einer Vielzahl von Veröffentlichungen sind durch *in-vitro*-Experimente diese Interaktionen und die dadurch bedingten Veränderungen der Interaktionspartner durch Polyamine beschrieben. Es ist zwar schwierig, die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse zu bewerten, aber es erscheint klar, dass Polyamine die RNA- und DNA-Struktur, die Funktion der Ribosomen und die Aktivität zahlreicher Enzyme, einschließlich Kinasen und Phosphatasen, beeinflussen (Pegg 2009). Polyamine sind an der Kondensation und Regulation von DNA und RNA beteiligt. Die DNA-Kondensation geschieht, indem die positiv geladenen Polyamine als elektrostatische Brücken zwischen DNA und Phosphat fungieren (Raspaud, et al. 1998). Polyamine sind außerdem in den Chromatinumbau involviert, da sie die Histon-Acetylierung beeinflussen (Hobbs, et al. 2002). In Phospholipidmembranen erhöhen Spermidin und Spermin die Rigidität der Membran durch Komplexbildung mit Phospholipiden und Proteinen. Außerdem entfalten sie dadurch antioxidative Effekte und verhindern die Peroxidation von Lipiden (Tadolini, 1988). Darüber hinaus beeinflussen Polyamine Signaltransduktionskaskaden (Bachrach, et al. 2001). Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise fördert Spermidin die Phosphorylierung von Tyrosinkinase und ERK 1/2 (p42 und p44) und aktiviert das nukleäre Onkogen c-myc, welches als

**Abb. 2 : Polyaminsynthese**

In eukaryonten Zellen werden die drei Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin durch eine Serie von Reaktionen aus Arginin (via Ornithin oder alternativ Agmatin) und Methionin (via S-Adenosyl-Methionin) synthetisiert. Arginin wird durch Arginase zu Ornithin hydrolysiert. Ornithindecarboxylase setzt Ornithin durch Decarboxylierung zu Putrescin um. Alternativ wird Arginin durch Arginindecarboxylase zu Agmatin decarboxyliert und dieses durch Agmatinase weiter zu Putrescin umgesetzt. In den nächsten beiden Schritten erfolgt die Anlagerung von Aminopropylgruppen aus decarboxyliertem S-Adenosyl-Methionin an Putrescin und anschließend an das so entstandene Spermidin unter Bildung von Spermin. Diese beiden Reaktionen werden durch Spermidinsynthase und Sperminsynthase katalysiert.

SAMS = S-Adenosyl-Methionin Synthetase; SAMDC = S-Adenosyl-Methionin Decarboxylase; ARG = Arginase; ODC = Ornithindecarboxylase; ADC = Arginindecarboxylase; AGM = Agmatinase; SpdS = Spermidinsynthase; SpmS = Sperminsynthase; dSAM = decarboxyliertes S-Adenosyl-Methionin; MTA = Methyl-Thioadenosin.

Transkriptionsfaktor betrachtet wird. Diese Ergebnisse erklären die Rolle der Polyamine bei der Zellproliferation und -differenzierung (Bachrach, et al. 2001).

Im Gehirn beeinflussen Polyamine zudem die neuronale Erregbarkeit durch Modulation von Ionenkanälen und Rezeptoren (Ficker et al., 1994; Bowie und Mayer, 1995; Williams, 1997; Nichols und Lopatin, 1997; Ahern et al., 2006). Als molekulare Interaktionspartner für Polyamine im Gehirn wurden u.a. Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ (Ransom und Stec, 1988; Williams et al., 1991), sowie einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Lopatin et al., 1994, Nichols und Lopatin, 1997; Oliver et al., 2000) identifiziert. Somit konnte eine modulatorische Aktivität von Polyaminen auf die Erregungsbildung in Neuronen gezeigt werden. Auch in Gliazellen wie den retinalen Müllerzellen tragen sie

zur Gleichrichtung von K_{ir} -Kanälen bei und verstärken die Ausbreitung von Molekülen im glialen Synzytium (Kucheryavykh et al., 2008; Benedikt et al., 2012).

Polyamine sind essentiell für Wachstum, Teilung und Differenzierung von Zellen. So wird durch die Deletion sowohl des ODC-Gens (Pendeville, et al. 2001) als auch des S-Adenosyl-Methionin Decarboxylase (SAMDC)-Gens (Nishimura, et al. 2002) die Synthese von Spermidin unterdrückt, was bei Mäusen bereits in einem frühen embryonalen Stadium tödlich ist. Spermin wird auch für normales Wachstum, Überleben und Fortpflanzungsfähigkeit benötigt. So führte in betroffenen männlichen SpmS-knockout Mäusen die Beseitigung jenes X-Chromosomenanteils welches die SpmS beinhaltet, zu einem auffälligen Phänotyp mit verändertem Phosphatstoffwechsel, Symptomen von Rachitis, Hyperaktivität, Innenohranomalien, Sterilität und schwerer postnataler Wachstumsretardierung (Wang, et al. 2004).

Polyamine sind in Wachstum und Differenzierung einer großen Zahl von Geweben in Säugetieren sowie in Umbauprozesse involviert (Gerner und Meyskens, 2004). Sie sind daher Gegenstand der Krebsforschung, seit 1968 ein Zusammenhang zwischen gesteigerter Polyaminsynthese, Zellwachstum und Krebs festgestellt wurde (Russel und Snyder, 1968). Die Polyaminkonzentrationen in Urin und Serum von Krebspatienten waren erhöht (Moulinoux, et al. 1991). Yodfat, et al. (1988) zeigten aber auch, dass Polyamine nicht für die frühzeitige Erkennung von Krebs geeignet sind, da die "normalen" Urin- und Serum-Polyaminkonzentrationen erheblich variieren. Der Anstieg der Konzentrationen beim Einzelnen kann jedoch auf den Beginn eines malignen Prozesses hinweisen. Die Bestimmung der Polyaminkonzentrationen in Urin und Serum als Instrument der Therapieüberwachung bei Krebspatienten und somit auch zur Erkennung von Remission und Rezidiv wird allgemein anerkannt (Bachrach, 2004). Zum Beispiel treten erhöhte Polyaminkonzentrationen bei Patienten mit epithelialen Tumoren wie colorektalen-, gastrointestinalen-, Haut- und Prostatatumoren auf (Gerner und Meyskens, 2004).

Die Aktivität der ODC ist im Tumorgewebe gesteigert (Narisawa, et al. 1989; Nishioka, et al. 1991). Dies stellt einen interessanten Ansatz für die Entwicklung antiproliferativer Medikamente dar (Wallace und Fraser, 2004). Hierzu zählt Difluoromethylornithin (DFMO), das 1978 synthetisiert wurde. Es inaktiviert die ODC irreversibel. DFMO ist seither der am besten untersuchte Polyaminstoffwechsel-Inhibitor, der die Krebsentwicklung im Tiermodell unterdrückt und in klinischen Studien untersucht wurde (Meyskens und Gerner, 1999). Inhibitoren des Polyaminstoffwechsels sollen in der Krebsbehandlung und -prävention Anwendung finden (Gerner und Meyskens, 2004).

Die DFMO-Behandlung von APC^{Min/+} Mäusen, ein Maus-Modell der humanen familiären adenomatösen Polyposis coli, unterdrückt die Bildung von intestinalen Tumoren, da es bei dieser Erkrankung zu einem Verlust der Funktion des adenomatösen Polyposis coli (APC) - Tumor-Suppressor-Gens kommt, was eine Erhöhung der ODC-Aktivität und somit der Polyamin-Biosynthese verursacht und daher die Tumorbildung fördert. Experimentelle Studien mit Mausmodellen zeigen, dass Kombinationen von DFMO und nichtsteroidalen Antirheumatika potente Inhibitoren von Darmkrebs sind. Klinische Studien haben gezeigt, dass DFMO gut vertragen wird und dass die Entwicklung von Präkanzerosen der Haut verhindert wird (Gerner und Meyskens, 2004).

Desweiteren sind Polyamine in Entzündungsprozesse involviert (Babbar et al., 2007) und an der Pathogenese neurologischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington (Gratacos et al., 2001; Antony et al., 2003; Colton et al., 2004) beteiligt. In einer Übersichtsarbeit stellen Wallace und Fraser (2004) die Veränderungen im Polyamin-Stoffwechsel und deren Zusammenhänge mit bestimmten Erkrankungen dar. Die Dysregulierung des Polyamin-Stoffwechsels spielt auch bei Apoptose-Vorgängen eine wichtige Rolle. Obwohl die genauen Wirkprinzipien der Polyamine bei der Apoptose noch nicht ganz geklärt sind, ist es offensichtlich, dass hohe Konzentrationen sowie extrem niedrige Konzentrationen dieser stark geladenen Moleküle, die spezifischen zellulären Wechselwirkungen beeinträchtigen und sich auf wichtige physiologische Funktionen auswirken. Funktionsstörungen der Polyamine stören den Zellzyklus und/oder führen, in Abhängigkeit von den biologischen Bedingungen, zur Aktivierung des Zelltods (Schipper et al., 2000). Ein Abfall der Polyaminkonzentration fördert die Apoptose, da er zum Zellzyklusarrest bzw. zur Beeinträchtigung des p53/p21/Rb-Zellzyklus-Regulationsweges führt (Kramer et al., 1998; Li et al., 1999; Ray et al., 1999). Da Polyamine für die Regulation von Ionentransportvorgängen und die Stabilisierung wichtiger zellulärer Komponenten wie Zellmembranen und Chromatinstrukturen wichtig sind, kommt es beim Absinken der Polyaminkonzentration zur Destabilisierung wichtiger Zellstrukturen und damit zu einem Verlust der Zellintegrität und schließlich zum Zelltod (Schipper et al., 2000).

Ein weiterer Weg polyamininduzierter Apoptose ist die Oxidation von Polyaminen durch die kupferhaltigen Aminoxygenasen Polyaminoxidase und Sperminoxidase (Agostinelli, 2004; Rea, 2004). Aminoxygenasen katalysieren die oxidative Desaminierung von biogenen Aminen und Polyaminen zu den Reaktionsprodukten H₂O₂ und Aldehyden, welche oxidativen Stress und Zelltod induzieren. H₂O₂ kann die innere Mitochondrienmembran

überwinden und somit direkt mit endogenen Molekülen und Strukturen interagieren und oxidativen Stress induzieren (Agostinelli et al., 2004; Rea, 2004). Die Tatsache, dass Aminoxidasen in viele pathophysiologische Prozesse involviert sind, öffnet Möglichkeiten in der Erforschung neuer Behandlungsstrategien zahlreicher Erkrankungen, zum Beispiel in der Tumorthherapie (Agostinelli et al., 2004; Agostinelli et al., 2006).

1.2. Arginin und Arginase in der Polyaminsynthese

Arginin

Die Struktur von Arginin ist bereits seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts bekannt (Abb. 3). Im Stoffwechsel von Eukaryoten ist Arginin eine der vielseitigsten Aminosäuren. Es ist ein Vorläufermolekül für die Synthese von Harnstoff und Ornithin sowie im weiteren Sinne vom Stickstoffmonoxid (NO), Polyaminen, Prolin, Kreatin und Agmatin. Der menschliche Körper gewinnt Arginin aus der Nahrung, aus endogener Synthese und durch Abbau körpereigener Proteine (Abb. 3). Während einer Nahrungskarenz stammen rund 85% des benötigten Arginins aus dem Proteinstoffwechsel (Wu und Morris, 1998). Der Rest wird synthetisiert. Auf den Gesamtorganismus bezogen, wird der größte Teil dieser endogenen Neusynthese von Dünndarm und Niere bewältigt (Morris, 2006). Die Argininbiosynthese erfolgt über den Harnstoffzyklus. Beim gesunden Erwachsenen wird durch endogene Synthese ausreichend Arginin für den Stoffwechsel bereitgestellt. Bei Entzündungen, Fehlfunktionen des Dünndarms oder der Niere und generell bei Neu- oder Frühgeborenen übersteigt der Bedarf jedoch die Eigensynthese. Aus diesem Grund wird Arginin als semiessentielle Aminosäure angesehen (Flynn et al., 2002). Arginin wird von fünf Enzymen als Substrat genutzt: der Arginindecarboxylase, der Arginin-Glycinamidinotransferase, der Arginase (Arg), der Stickstoffmonoxidsynthase und der Arginyl-tRNA-Synthetase (Abb. 3).

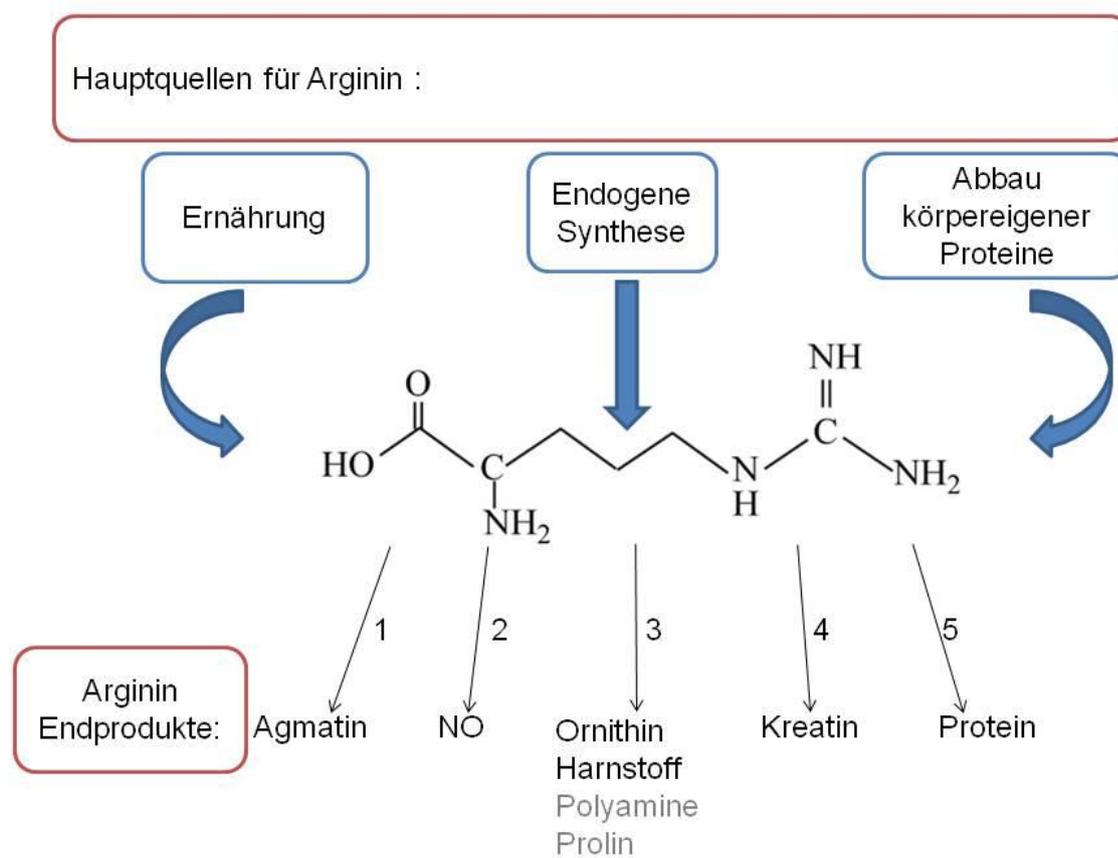


Abb. 3 : Überblick über den Argininstoffwechsel in Säugetieren.

Dargestellt sind die Hauptquellen des Arginins und die vielfältigen Stoffwechselendprodukte, sowie die am Argininstoffwechsel beteiligten Enzyme: 1 = Arginindecarboxylase, 2 = Stickstoffmonoxidsynthase, 3 = Arginase, 4 = Arginin-Glycinamidinotransferase, 5 = Arginyl-tRNA-Synthetase (verändert nach Morris, 2009).

Beim Argininabbau entstehen durch die Arginase-katalysierte Hydrolyse Harnstoff und Ornithin. Ornithin dient als Vorläufermolekül für die Synthese von Polyaminen (Abb. 2) oder Prolin (Morris, 2009). Daher ist in einigen Zellen eher Arginase als ODC ein limitierender Faktor der Polyaminsynthese (Li et al., 2001).

Unter physiologischen Bedingungen können Stickstoffmonoxidsynthase und Arginase (Abb. 3) wechselseitig das Vorhandensein des Substrates Arginin limitieren (Wu und Morris, 1998). Darüber hinaus ergeben sich aus der verminderten Verfügbarkeit von Arginin, bedingt durch den Argininabbau durch Arginase (Abb. 3), eine Reihe von Konsequenzen für die weiteren Produkte des Argininstoffwechsels, wie beispielsweise eine verringerte NO-Synthese oder Änderungen in der Synthese anderer Proteine (Bsp. kationische Aminosäuretransporter- CAT-1, induzierbare Isoform von NOS-iNOS) (Abb. 4) (Morris, 2006).

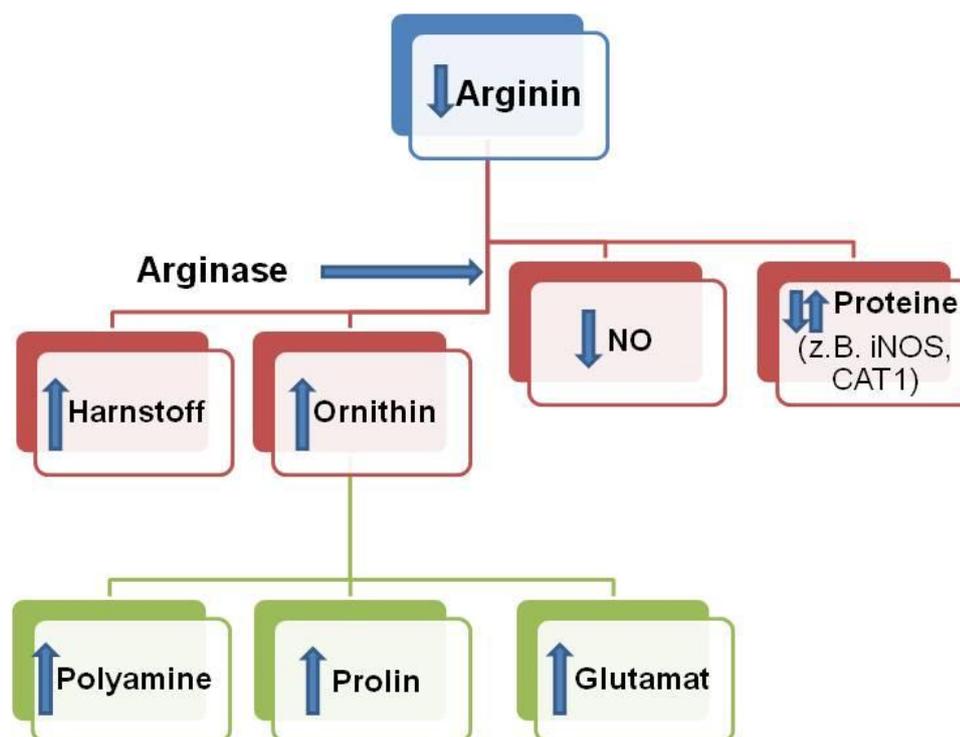


Abb. 4 : Konsequenzen einer gesteigerten Arginaseaktivität.

Die Pfeile deuten entweder Anstieg und Abfall von Menge oder Verhältnis der angegebenen biochemischen Produkte an. Abhängig vom jeweiligen Protein, resultiert eine verminderte Argininverfügbarkeit entweder in einer verringerten Translationseffizienz (z.B. iNOS) der entsprechenden mRNA oder einer gesteigerten Translationseffizienz (z.B. CAT-1). (verändert nach Morris, 2009).

Arginase

Arginase ist ein homotrimeres Metalloenzym, dessen Untereinheiten jeweils ein zweikerniges Mangan-Cluster enthalten. Die reversible Dissoziation eines oder mehrerer Ionen geht mit einer Verminderung der katalytischen Aktivität des Enzyms einher (Grillo und Colombatto, 2004).

Die Arginase nimmt eine zentrale Position im Argininstoffwechsel ein (Abb. 2). Es werden zwei Isoenzyme, Arginase 1 (Arg1) und Arginase 2 (Arg2), exprimiert (Jenkinson et al., 1996), die im Hinblick auf ihre enzymatischen Eigenschaften und den Bedarf an Mangan als Ko-Faktor vergleichbar sind (Mori, 2007). Sie unterscheiden sich jedoch in der Proteinstruktur, in der Verteilung und Expression im Gewebe und in ihrer subzellulären Lokalisation (Grody et al., 1987; Morris et al., 1997). Sie werden durch separate, auf unterschiedlichen Chromosomen gelegene, Gene kodiert (Morris 2009). Die beiden Arginasegene werden unabhängig voneinander reguliert. Sie können in verschiedenen Zelltypen exprimiert werden und sind durch zahlreiche Faktoren, wie z.B. LPS, Zytokine, Leber-X-Rezeptoren und unter bestimmten pathologischen Bedingungen

induzierbar (Mori und Gotoh, 2000; Morris, 2000; Mori, 2007). Die Arg1, ein zytosolisches Enzym mit einem isoelektrischem Punkt im alkalischen Bereich, wird als Enzym des Harnstoffzyklus hauptsächlich in der Leber exprimiert und nur in einem limitierten Umfang in einigen anderen Geweben z.B. Pankreas, Thymus und Speicheldrüsen (Morris et al., 1997; Yu et al., 2003). Die vorrangige Aufgabe von Arg1 scheint in der Entgiftung von Ammoniumionen in Form von Harnstoff zu liegen. Im Gegensatz dazu wird die Arg2, ein mitochondriales Enzym mit einem isoelektrischem Punkt im neutralen Bereich, moderat in Niere, Gehirn, Dünndarm, Milchdrüsen und Makrophagen, aber nur schwach in der Leber (Grody et al., 1987; Morris et al., 1997; Munder et al., 1999; Yu et al., 2003; Mori, 2007) exprimiert. Arg2 dient wahrscheinlich hauptsächlich der Produktion von Ornithin als Vorläufer von Prolin und Polyaminen.

Ein Übermaß an NO kann in einigen Zellen, z.B. Makrophagen, Apoptose induzieren. NO wird über die NOS aus Arginin synthetisiert. Arginin ist folglich gemeinsames Substrat von NOS und Arginase, weshalb beide Enzyme darum konkurrieren (Gotoh und Mori, 1999). In aktivierten Mausmakrophagen wurde durch Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- γ (IFN- γ) die induzierbare Form der NOS (iNOS) und damit die NO-vermittelte Apoptose induziert. Wird in diesen Zellen mit Hilfe von Dexamethason und cAMP zusätzlich die Expression von Arg2 gesteigert, entsteht weniger NO und die Apoptoserate ist vermindert (Gotoh und Mori, 1999). Arg2 verhindert die NO-abhängige Apoptose von Zellen durch den Verbrauch intrazellulären Arginins und verringert die NO-Produktion. Im Gegensatz dazu ist in aktivierten Makrophagen der Maus der endogene Arg1-Gehalt nicht limitierend für die NO-Synthese, wohl aber für die Produktion der Polyamine (Kepka-Lenhart et al., 2000). Die Balance zwischen iNOS und Arginase wird über T-Helferzellen (Th1- und Th2-Zellen) reguliert. Diese sezernieren stimulierende Zytokine, welche Einfluss auf die funktionelle Entwicklung von Makrophagen und dendritischen Zellen nehmen (Lu et al., 1996). Th1-Zellen produzieren Interleukin (IL)-2, IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF), während Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 produzieren (Lu et al., 1996; Munder et al., 1999). So induzieren Th1-Zellen vorrangig iNOS und Th2-Zellen eher Arginase. Nach Stimulation der Mausmakrophagen durch die Zytokine von Th1- und Th2-Zellen zeigte sich, dass Arg1 durch IL-4 und IL-10 aus Th2-Zellen induziert werden kann. Demgegenüber konnte Arg2-Expression durch die Stimulation von Th1- oder Th2-Zellen nicht signifikant verändert werden. Arg2 existiert in unstimulierten Makrophagen. Die iNOS kann in dendri-

tischen Zellen durch Stimulation mit IFN- γ und LPS induziert werden (Lu et al., 1996). Diese Ergebnisse deuten auf eine interessante Gemeinsamkeit zwischen iNOS und Arginase hin: Beide haben eine konstitutiv aktive und eine induzierbare Isoform, wobei letztere durch die Th1-Th2-Balance reguliert wird (Lu et al., 1996; Munder et al., 1999; Grillo und Colombatto, 2004).

Wie anhand der Mausmakrophagen beschrieben, exprimieren einige Zelltypen, beispielsweise Endothelzellen der Aorta der Ratte, beide Arginase-Typen (Li et al., 2001). Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Arginase-Isoenzyme in Mitochondrien bzw. im Zytoplasma bietet Spielraum zur Regulation des Argininstoffwechsels, wie er bei Mausmakrophagen oder Enterozyten postuliert wurde (Gotoh und Mori, 1999; Li et al., 2001; Grillo und Colombatto, 2004).

Die Arginase-Isoenzyme sind an einer Reihe von Krankheitsprozessen beteiligt. Hierzu gehören u.a. verschiedene Formen von Gefäß-, Lungen- und Krebserkrankungen sowie Infektionskrankheiten und Erkrankungen des Immunsystems (Bansal und Ochoa, 2003; Lange et al., 2004; Mori und Gotoh, 2004; Bronte und Zanovello, 2005; Rodriguez und Ochoa, 2008). Aber auch im Zusammenhang mit einigen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn wurde die Beteiligung der Arginase untersucht (Lee et al., 2003; Hansmann et al., 2010; Swamy et al., 2011).

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Zur Expression der Arginase in der Maus liegen bereits Daten aus *in situ* Hybridisierung sowie Immunzytochemie vor (Yu et al., 2003). Hiernach ist die Arg1 weit verbreitet, wird aber besonders stark in der Leber exprimiert. Arg2 ist dagegen weniger stark verbreitet, wird aber in Dünndarm und Niere stark exprimiert. Im Gehirn kommen beide Isoformen vor (Yu et al., 2001).

In der Ratte liegen bisher nur wenige Daten zur Expression in Neuronen vor (Braissant, et al. 1999; Choi, et al. 2012). Arg1 wird im Hippocampus der Ratte deutlich schwächer als Arg2 exprimiert (Liu et al., 2003).

Um die Bedeutung der verschiedenen Stoffwechselwege für die Polyaminsynthese im Gehirn der Ratte abzuschätzen, soll in der vorliegenden Arbeit

- 1) ein polyklonaler, monospezifischer Antikörper, der beide Arginase-Isoformen erkennt, hergestellt werden. Dieser pan-Arginase-Antikörper soll gemeinsame Epitope erkennen.

- 2) dieser Antikörper in Arg1- bzw. Arg2-spezifische Fraktionen aufgetrennt und beide Isoformen im Rattengehirn nachgewiesen werden.
- 3) mit Hilfe des pan-Arginase-Antikörpers die subzelluläre Lokalisation des Enzyms in Neuronen und Gliazellen untersucht werden.
- 4) anschließend der pan-Arginase-Antikörper für vergleichende immunzytochemische Untersuchungen zur differentiellen Expression der Polyaminsynthesenzyme des klassischen sowie des alternativen Syntheseweges im Rattengehirn eingesetzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben somit Aufschluss über die funktionelle Relevanz der beiden Polyaminsynthesewege.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeine Materialien

2.1.1. Chemikalien

2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure] di-Ammoniumsalz (ABTS)	Roth (Karlsruhe)
3,3- Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 37,5:1)	Serva (Heidelberg)
Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 29:1)	Serva (Heidelberg)
Ammoniumnickelsulfat 3%	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Araldit	Serva (Heidelberg)
Bicinchoninsäure-Dinatrium (BCA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bleinitrat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Complete Protease Inhibitor Cocktail, Tabletten	Roche (Mannheim)
Kresylviolett-Acetat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriummonohydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe)
di-Natrium-Tetraborat	Merck (Darmstadt)
DMP 30	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dodeceny succinicanhydrid (DDSA)	Serva (Heidelberg)
DPX	Fluka (Buchs, Schweiz)
ECL-Detektionssystem	Amersham Biosciences (Freiburg)
EDTA- Na_2	Merck (Darmstadt)
Eisessig / reine Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Entellan	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Gel Code Blue Stain Reagent	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences (Freiburg)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Größenmarker für SDS-Page, vorgefärbt	Fermentas
HEPES Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Hexan	Merck (Darmstadt)
Imidazol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchromosulfat-12-hydrat	Merck (Darmstadt)
Ketamin (Ketavet®)	Parke-Davis (Berlin)
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Merck (Darmstadt)
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Life Technologies (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Medetomidin (Domitor®)	Pfizer
Methanol (CH ₃ OH)	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumcitrat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer (Mannheim)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natrium-Tartrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarosematrix (Ni-NTA)	QIAGEN
Nonidet P40 (NP-40)	Roche
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Phenylhydrazin	Merck (Darmstadt)
Pikrinsäure	Merck (Darmstadt)
PIOLOFORM®	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau-S	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Propylenoxid	Serva (Heidelberg)
Rotiload I (SDS-Probenpuffer, reduzierend)	Roth (Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	Gibco (Darmstadt)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
SP-Sepharose 66% Suspension, fast flow	Pharmacia Biotech (Schweden)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tissue Tec	Jung (Nussloch)
Triethanolamin (TEA)	Roth (Karlsruhe)
Toluidinblau	Merck (Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween® 20	Roth (Karlsruhe)
Uranylacetat	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)

2.1.2. Proteine, Enzyme, Kits

ABC-Elite kit, Vectastain	Vector (Burlington, USA)
Rinderserum, bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
fetales Kälberserum	PAA (Cölbe)
Lipofectin® Reagent	Invitrogen Life Technologies (Darmstadt)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Ziegenserum, normal goat serum (NGS)	PAN-Systems (Aidenbach)
Pferdeserum, normal horse serum (NHS)	PAN-Systems (Aidenbach)

Vektor pGEX-4T-1

Amersham Biosciences
(Freiburg)

Vektor pET32b(+)

Novagen (Darmstadt)

2.1.3. Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antigen	Spender	Markierung	ELISA	Western Blot	ABC-DAB; LM	ABC-DAB; EM	Flumi	Hersteller
Kaninchen IgG	Ziege	Peroxidase	1:1000					Vector, Burlington, USA
Kaninchen IgG	Ziege	Peroxidase		1:10000				Jackson Immuno Research
Kaninchen IgG	Ziege	Biotin			1:2000	1:1000		
Maus IgG	Esel	Cy2					1:250	Vector
Esel IgG	Kaninchen	Cy3					1:100-250	Vector
Esel IgG	Ziege	Cy2					1:200	Vector
Calbindin	Maus	-					1:5000	Sigma
Calretinin	Ziege	-					1:2500	Chemicon
Parvalbumin	Maus	-					1:5000	Sigma

2.1.4. Geräte und Hilfsmaterialien

Blotkammer (Tank Transfer Unit) TE22

Hoefler

Blotpapier

BIO-RAD (München)

Deckgläschen

Menzel-Gläser
(Braunschweig)

Dialyseschlauch

Roth (Karlsruhe)

Dialyseschlauchklemmen

Roth (Karlsruhe)

Diamantmesser

Diatome (Schweiz)

Elektronenmikroskop, Zeiss-TEM 900

Carl Zeiss (Oberkochen)

Flexible Assay-Platte

BD Falcon (USA)

ELISA reader, HT II

Anthos (Wals, Austria)

Entwicklermaschine Curix60	Agfa
Fraktionssammler FC 203 B	Abimed Gilson (USA)
Gel-Gießstand (4-gel caster, SE275)	Hoefer
Gradientenmischer SG30	Hoefer
Horizontalschüttler KS 250 basic	Ika Labortechnik (Staufen)
Hyperfilm ECL	Amersham
Kryostat Frigocut 2800	Reichert-Jung (Nussloch)
Kühlzentrifuge, Kendro Labofuge 400R	Heraeus (Hanau)
Micro Centrifuge Model SD	Roth (Karlsruhe)
Mikrotest 96 Zellkulturplatte	BD Falcon (USA)
Minishaker KMS1	Ika Labortechnik (Staufen)
Mini Vertikal-Elektrophorese Kammer SE250	Hoefer
Multiwell 24 well-Zellkulturplatte	BD Falcon (USA)
Nickel- oder Kupfergitter	Plano
Objektträger und Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Peristaltikpumpe Minipuls 3	Abimed Gilson (USA)
Petrischalen	Roth (Karlsruhe)
Photometer 112, UV/VIS Detecor	Abimed Gilson (USA)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pro Scan 1K Frametransfer Kamera	Carl Zeiss (Oberkochen)
Protran® Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman / Schleicher & Schuell
Quarzsand/Seesand, -50+70 mesh	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Säule Superdex 200 prep grade	Pharmacia Biotech (Schweden)
Schreiber BD 111	Kipp & Zonen / Sci-Tec Instruments (Kanada)
Taumler Polymax 1040 T	Heidolph (Schwabach)
Ultramikrotom, Reichert Ultracut S	Leica
Ultrazentrifuge J2-HS	Beckman (Krefeld)
Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf (Hamburg)

2.2. Ratten

Für diese Arbeit wurden 12 erwachsene männliche Wistar-Ratten (250 bis 300 g) verwendet. Diese Tiere wurden von der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) an der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Bei der Handhabung der Ratten wurden die Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft (86/609/EEC) und die Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes eingehalten. Die Experimente wurden vom Berliner Tier-Ethik-Komitee genehmigt (LaGeSo-Nr. G 0168/01). Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten (22 °C, 12-stündiger Licht/Dunkel-Wechsel, Nahrung und Wasser zur freien Verfügung).

2.3. Herstellung und Aufreinigung des anti-Arg1-Antikörpers

Vorbemerkungen

Arg1- und Arg2-pET32b(+) wie auch Arg1- und Arg2-pGEX-4T-1-Plasmid-DNA wurden von Dr. Christian Derst zur Verfügung gestellt. Die cDNA Fragmente welche die C-terminalen Enden von Arginase 1 (Arg1) (GenBank-Acc.No. NM_017134, Nukleotide: 363-1328, 211 Aminosäuren) und Arginase 2 (Arg2) (GenBank-Acc.No. NM_019168, Nukleotide: 497-1367, 223 Aminosäuren) kodieren wurden amplifiziert. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden mit XhoI Restriktionsstellen in die bakteriellen Expressionsvektoren pGEX-4T-1 (Pharmacia, Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein) und pET32b(+) (6His-markiertes-Thioredoxin (6HisTR) Fusionsprotein) kloniert. Sequenz und Orientierung der inserierten cDNA-Fragmente beider Vektoren wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. GST-Arg1- und GST-Arg2-Fusionsproteine sowie His-Arg1- und His-Arg2-Fusionsproteine wurden im *E. coli*-Stamm BL21DE3 überexprimiert und unter Verwendung von entweder Glutathion-Sepharose 4B oder Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarosematrix gereinigt. Danach wurden Kaninchen mit gereinigtem GST-Arg1-Fusionsprotein immunisiert (Pineda). Das Rohserum wurde anschließend zur Antikörperaufreinigung und Charakterisierung verwendet.

2.3.1. Entfernung von IgM-Immunglobulinen

Da IgM-Antikörper für immunzytochemische Anwendungen erhebliche Nachteile aufweisen, mussten zunächst Immunglobuline der IgM-Klasse aus dem Rohserum entfernt werden. Dazu wurden die Antikörper (3,5 ml Rohserum) auf eine Superdex-S200-Säule geladen, die von den größeren IgM-Antikörpern schneller durchlaufen wurde als von den kleineren IgG-Antikörpern.

Bei der Säulenpassage wurde der Proteingehalt des Durchlaufes von einem UV-Photometer (280 nm) kontinuierlich gemessen, mit einem Schreiber protokolliert und der Durchlauf in Fraktionen gesammelt. Die IgG-Peak-Fraktionen wurden mit einem ELISA-Test auf Aktivität gegen das Antigen 6HisTR-Arg1 untersucht und gesammelt. Diese Fraktionen hatten insgesamt ein Volumen von 20 ml. Die Antikörper befanden sich damit in einer, bezogen auf das Rohserum, Verdünnung von 1:6.

2.3.2. Präabsorption von anti-ARG1-Superdex-Pool mit GST-Fusionsprotein

Für die Entfernung der Aktivität gegen den Fusionsanteil GST wurden vier Nitrocellulose-Membranen (je 8x6 cm) über Nacht bei 4 °C mit 10 µg/ml GST-Protein beschichtet und anschließend bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde mit 5% Ziegen Serum (normal goat serum, NGS) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.8 g NaH₂PO₄ und 0.4 g NaOH in 1 l H₂O, pH 7.4) abgesättigt. Anschließend wurden die vier GST-Nitrocellulose-Membranen mit dem Superdex-Pool (20 ml Superdexpool 1:6 auf 50 ml 1:15 mit 5% NGS in PBS, 0,1% Natrium-Azid aufgefüllt) beschickt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

2.3.3. Präabsorption des vorgereinigten Serums mit 6HisTR-Agmatinase

Zur weiteren Reinigung des nach Entfernung der anti-GST-Aktivität gewonnenen Membranüberstands wurde ein nicht mit dem für die Immunisierung verwendeten Antigen verwandtes Protein, 6HisTR-Agmatinase (6HisTR-Agmat), eingesetzt. Zwei zuvor bereits über Nacht bei 4 °C mit 20 µg/ml 6HisTR-Agmat beschichtete Nitrocellulose-Membranen (je 8x6 cm) wurden bei RT für eine Stunde mit 5% NGS in PBS blockiert. Danach wurde der unter 2.3.2. gewonnene Überstand auf die zwei Agmatinase-pET-Nitrocellulose-Membranen verteilt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

2.3.4. Affinitätsreinigung der Antikörper

Die Affinitätsreinigung der Antikörper erfolgte auf ähnliche Weise wie die zuvor beschriebene Vorreinigung an Nitrocellulose-Membranen. Hierzu wurde nicht das für die Immunisierung verwendete Fusionsprotein GST-Arg1 (pGEX-Expressionssystem) sondern ein mit Hilfe des pET-Expressionssystems gewonnenes Fusionsprotein (Arg1-Thioredoxin) verwendet. Damit wird die unerwünschte Mitaufräumung von Antikörpern gegen das für die Immunisierung verwendete Trägerprotein GST minimiert. Vier Nitrocellulose-Membranen (je 8x6 cm) wurden mit 10 µg/ml 6HisTR-Arg1 beschichtet und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden dann kurz in PBS gewaschen und danach bei RT für eine Stunde mit 5% NGS in PBS geblockt. Anschließend wurden die Membranen mit dem vorgereinigten anti-Arg1-Serum über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mit saurem Elutionspuffer (200 mM Glycin, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA in H₂O, pH 2,5) für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler eluiert. Direkt im Anschluss wurden die Eluate in Dialyseschläuche (14 kD Ausschlussgrenze) überführt und gegen 20 mM Phosphatpuffer (12,1 g Natriumdihydrogenphosphat, 1,7 g Dinatriummonohydrogenphosphat in bidest. H₂O, pH 6,0) über Nacht dialysiert.

2.3.5. Aufkonzentration des anti-Arg1-Antikörpers über SP-Sepharose

Die Volumeneinengung des Dialysats erfolgte über eine SP-Sepharose-Säule. Hierzu wurde die Spitze einer Pasteurpipette etwas gekürzt und mit grobem Quarzsandkiesel abgedichtet. Dann wurde die Säule etwa 5 mm hoch mit feinem Quarzsand gefüllt und vor dem Beladen mit dem Säulenmaterial mit Laufpuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 6) gewaschen und ihre Beständigkeit getestet. Das Säulenmaterial, SP-Sepharose (4 ml 66% Suspension, fast flow), ist ein Kationenaustauscher dessen Sulfopropylgruppen oberhalb von pH 2 negativ geladen sind. Das Dialysat wurde unter Zuhilfenahme einer Peristaltikpumpe auf die SP-Sepharose-Säule geladen. Die Laufgeschwindigkeit betrug 7ml/h. Unterhalb des isoelektrischen Punkts von Immunglobulinen verbleiben die positiv geladenen Antikörper in der Säule. Eluiert wurden die Antikörper dann mit einem Elutionspuffer (200 mM Natrium-Karbonat-Puffer, Na₂CO₃, pH 9,0) oberhalb des isoelektrischen Punktes. In diesem pH Bereich liegen die Antikörper negativ geladen vor. 16 Fraktionen zu je 200 µl wurden eluiert und per ELISA die immunologische Aktivität bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und über Nacht gegen PBS (pH

7,6) dialysiert. Das Volumen der Antikörperlösung wurde so von 40 ml auf 2 ml eingengt, mit Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.6. Auftrennung des pan-Arginase-Serums von Arg1- und Arg2-reaktiven

Anteilen

Die Aufreinigung des pan-Arginase-Serums erfolgte auf gleiche Weise wie die Affinitätsreinigung der Antikörper an Nitrocellulose-Membranen. Dafür wurde das Fusionsprotein 6HisTR-Arg2 (Arg2-Thioredoxin) verwendet. Eine Nitrocellulose-Membran (8x6 cm) wurde mit 20 µg/ml 6HisTR-Arg2 beschichtet und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Membran wurde dann auf dem Schüttler bei RT für eine Stunde mit 5% NGS in PBS geblockt. Danach wurde die Membran mehrmals für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das affinitätsgereinigte anti-Arg1-Serum (pan-Arginase-Serum) in einer Konzentration von 1:50 (200 µl anti-Arg1 in 10ml PBS) auf die Membran geladen und diese über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mit saurem Elutionspuffer (pH 2,5) für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler eluiert. Direkt im Anschluss wurden die Eluate in Dialyseschläuche (14 kD Ausschlussgrenze) überführt und gegen 20 mM Phosphatpuffer pH 6.0 über Nacht dialysiert. Überstand und Eluat wurden dann im Gelbett weiter eingengt und bei -20 °C gelagert.

2.4. Charakterisierung des Antikörpers

2.4.1. Detektion der spezifischen Antikörper im ELISA

Die immunologische Aktivität des Rohserums sowie der verschiedenen Reinigungsstufen wurde mit Hilfe eines ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) verifiziert. Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl des mit einer Konzentration von 1 µg/ml im Beschichtungspuffer (50 mM Na₂CO₃ in H₂O, pH 9,5) gelösten Antigens (6HisTR-Arg1) über Nacht beschichtet. Die Funktionalität des ELISA-Systems wurde durch Kaninchen-IgG-Positivkontrollen sichergestellt. Alle Inkubationen erfolgten bei RT und wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach der Beschichtung wurden verbleibende Proteinbindungskapazitäten der Mikrotiterplatte mit 1 mg/ml Rinder-Hämoglobin (Hb) in ELISA-Waschpuffer (EWP; 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0.5%

Tween 20, 3 mM NaN₃ in H₂O, pH 7.2) für 60 Minuten bei RT blockiert. Anschließend wurde mit jeweils 200 µl EWP dreimal gewaschen und mit jeweils 100 µl des in EWP-Hb (1 mg/ml Hämoglobin in EWP) verdünnten Erstantikörpers für eine Zeitdauer von mindestens 2 Stunden inkubiert. Danach wurde dreimal mit jeweils 200 µl PBS gewaschen und dann für eine Stunde mit je 100 µl des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers (Ziege-anti Kaninchen-Antikörper, P-GaR; 1:1000 in PBS-Hb) in PBS-Hb (10 mg Hämoglobin in 10 ml PBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der gebundene Zweitantikörper durch eine Peroxidase-Reaktion, die das Substrat ABTS zu einem farbigen Produkt umsetzt, quantitativ nachgewiesen. Hierzu wurden nach wiederholtem Waschen mit PBS je 100 µl der Inkubationslösung (9 ml Inkubationspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM CH₃COONa in H₂O, pH 4,2; 1 ml ABTS-Stammlösung: 100 mg ABTS zu 10 ml Inkubationspuffer; 1 µl 30% H₂O₂) für 5 Minuten in die Vertiefungen pipettiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Azid-Stopplösung (15 mM NaN₃ in PBS) beendet und die Extinktion wurde photometrisch im ELISA-Reader (bei 405 nm gegen 630 nm) bestimmt.

Kompetitiver ELISA

Der kompetitive ELISA wurde zur Bestimmung der Spezifität des anti-Arg1-Antikörpers verwendet und basiert auf der teilweisen bis vollständigen Blockade der Antigenbindungsstellen des zu untersuchenden Antikörpers durch Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen des korrespondierenden Antigens bzw. potentiell kreuzreagierender Proteine. Hierzu wird zunächst der geeignet verdünnte Antikörper mit einer ansteigenden Verdünnungsreihe der Testantigene über Nacht bei RT inkubiert. Im vorliegenden Fall wurde, neben GST-Arg1 und 6HisTR-Arg1, das Trägerprotein GST sowie das möglicherweise kreuzreagierende Fusionsprotein 6HisTR-Agmat getestet. Werden beide Antigenbindungsstellen eines bivalenten Antikörpers blockiert, stehen diese nicht mehr für die Detektion des an die ELISA-Platte gebundenen Antigens zur Verfügung und das gemessene Signal wird entsprechend vermindert. Die Aktivität des Antikörpers sollte also mit steigender Konzentration des spezifischen bzw. eines kreuzreagierenden Antigens sinken.

2.4.2. Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA)

Die Bicinchoninsäure-Reaktion dient der Bestimmung des Proteingehaltes in Proben. In einem Vorversuch wurden die Probenverdünnungen der Protein-Lösungen ermittelt und anschließend im Hauptversuch Doppelwerte bestimmt. Hierzu wurden je 400 µl BCA Reagenz (10 ml Lösung A zu 200 µl Lösung B; Lösung A: 1% Bicinchoninsäure Dinatrium, 1,7% Na₂CO₃, 0,16% Natrium-Tartrat-Dihydrat, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃ in H₂O, pH 11,25; Lösung B: 4% CuSO₄ x 5H₂O per 10 ml) mit 40 µl PBS, 40 µl BSA-Standard-Lösungen (0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml oder 200 µg/ml in PBS; BSA-Stocklösung 1 mg/ml BSA in PBS) oder den optimalen Probenverdünnungen versetzt und 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die erhaltenen Lösungen kühlten ab und wurden in die Wells (jeweils Doppelbestimmung) einer harten Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Extinktion bei 550 nm mit dem HT II ELISA Reader gemessen. Schließlich wurde aus den Extinktionen der Standard-Lösungen die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.4.3. Western Blot

Vorbemerkungen

Die Western Blots wurden freundlicherweise im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kristina Langnäse, Universität Magdeburg, Institut für Biochemie und Zellbiologie erstellt.

Vorbereitungen

Für den Western Blot wurden männliche erwachsene Wistar-Ratten mit Isofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Gehirn und Leber wurden rasch heraus präpariert, auf einer kalten Metallplatte bei 0 °C in Stücke geschnitten, in eiskalten Homogenisierungspuffer (10 mM TEA, 250 mM Saccharose, 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail) welcher Proteaseinhibitoren enthielt überführt und Ultraschallbehandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Homogenate 15 Minuten lang zentrifugiert (20000xg, 4 °C). Das Hirngewebe wurde in Puffer (320 mM Saccharose, 5 mM Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer (HEPES), Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, pH 7.4) homogenisiert. Dann wurde das Homogenat zuerst bei 900xg für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand zur Herstellung zytosolischer

Fraktion für 1 Stunde bei 100.000xg und 4 °C ultrazentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurde mittels Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA; Kap. 2.4.2.) bestimmt.

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden die Zellen 32 Stunden nach der Transfektion (Kap. 2.5.7.) durch Zentrifugation gewonnen. Die Zellen wurden anschließend in Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten), lysiert und dann bei 15.000 g für 30 Minuten zentrifugiert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Es wurden Gradientengele (5% bis 20% Acrylamid) verwendet. Jeweils vier Gele wurden parallel in einer Gel-Gießkammer unter Verwendung eines Gradientenmischers selbst hergestellt.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (Rotiload I, reduzierend) gemischt (3 Teile Probe plus 1 Teil Rotiload) und für 5 Minuten bei 98 °C erhitzt.

Nach der Abkühlung und Zentrifugation der Proben, wurden diese mit einer Mikrospritze in die Taschen des Gels pipettiert. Es wurde zusätzlich zur richtigen Zuordnung der Proteingrößen ein pre-stained Proteinmarker mit aufgetragen. Obere und untere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer gefüllt (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Die Trennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10 mA je Gel. Wenn nach 2 bis 2,5 Stunden die Lauffront (Bromphenolblau im SDS-Probenpuffer) die Unterkante der Glasplatte erreicht hat, wird die Trennung gestoppt.

Für den direkten Nachweis von Proteinen wurde das Gel erst in A. dest. (3x10 Minuten) gewaschen und dann mit einer Lösung basierend auf Coomassie-Brillant-Blau (Blue Stain Reagent) gefärbt. Das Gel ist ausreichend angefärbt, wenn alle Banden eines Proteinmarkers eindeutig zu sehen sind. Die Färbung wurde durch das Waschen des Gels in H₂O gestoppt (Coomassie-Färbung nicht abgebildet).

Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit Verdünnungen

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung der verwendeten Gele wieder.

	Trenngel 20%	Trenngel 5%	Sammelgel
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,4% SDS, 7,8 mM EDTA-Na ₂ ; pH 8,8)	2,75 ml	2,75 ml	_____
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 0,4% SDS, 7,8 mM EDTA-Na ₂ ; pH 6,8)	_____	_____	2,7 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 40% (37,5:1)	5,5 ml	1,4 ml	_____
Acrylamid/Bisacrylamid 40% (29:1)	_____	_____	1,3 ml
Glycerol	2,0 ml	0,6 ml	2,3 ml
H ₂ O	0,62 ml	6,2 ml	3,6 ml
APS (10%)	26,0 µl	40 µl	57,1 µl
TEMED	6,5 µl	6,5 µl	7 µl
Bromphenolblau	100 µl	_____	_____
Phenolrot	_____	_____	5 µl

Immunoblotting

Beim Western-Blot wurden die Proteine von einem Elektrophoresegel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden zunächst die Proteine durch eine SDS-PAGE (Kap. 2.4.3.) getrennt. Die für das Immunoblotting verwendeten Gele waren nicht mit Coomassie gefärbt. Für den folgenden elektrophoretischen Proteintransfer wurde ein Tank-Blot System verwendet. Die Transferkassetten wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gepackt. Als Transfermembran wurde Nitrocellulose benutzt. Die Tank-Blot-Kammer wurde mit eiskaltem Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol) gefüllt. Die Proteine aus dem Gel wurden bei einer Stromstärke von 200 mA in 90 Minuten auf die Membran übertragen. Nach dem Blot wurde die Nitrocellulose-Membran in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (tris buffered saline, TBS; 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) gewaschen und 5 bis 10 Minuten in Ponceaurot-Lösung (0,2% Ponceaurot in 3% Essigsäure) zur Visualisierung der Proteinbanden gegeben. Die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran wurden anschließend für mindestens 60 Minuten bei RT in Blockmilch (5% Magermilchpulver in TBS-Tween (TBST; 0,05% Tween20 in TBS)) geblockt. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran in eine anti-Arg1-Antikörper Lösung (Verdünnung 1:10.000; in 5% Magermilchpulver in TBST) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBST gewaschen und nachfolgend mit einem peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-

Antikörper, 1:10.000 in TBST, 0,5% Magermilchpulver enthaltend) für 4 Stunden bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde ungebundener Zweitantikörper durch waschen (3x je 10 Minuten) in TBST entfernt. Schließlich wurde die Nitrocellulose-Membran mit dem ECL-Detektionssystem entwickelt. Gleiche Volumina der beiden Detektionslösungen wurden zunächst vorgemischt, die Membran dann für 1 Minute in dieser Detektionslösung geschwenkt. Nach Abtropfen überschüssiger Detektionslösung wurde die Membran in Haushaltsfolie eingelegt. Danach erfolgte die Exposition auf einen Chemolumineszenzfilm (Hyperfilm ECL) in einer lichtdichten Röntgenkassette. Die Expositionszeit lag im Bereich von Sekunden bis wenigen Minuten. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (Curix60, Agfa) entwickelt. Für Blockadeversuche im Western Blot wurde der in Blockmilch verdünnte anti-Arg1-Antikörper für eine Stunde bei RT mit 10 oder 40 µg/ml 6HisTR-Arg1 vorinkubiert.

2.5. Immunzytochemie

2.5.1. Perfusions-Fixierung von Rattengehirnen

Vor dem Gebrauch wurden alle Lösungen filtriert. Für Immunzytochemie wurden erwachsene männliche Wistar Ratten mit einer Mischung aus Ketavet und Domitor (Verhältnis 1:5) anästhesiert und auf einem Korkbrett fixiert. Haut, Bauchraum und Thorax wurden eröffnet und die Tiere transkardial erst für 1 Minute mit 0,9% NaCl-Lösung und weitere 20 Minuten durch das PGPic-Fixierungsmittel (80 g Paraformaldehyd in 1,5 l bidest H₂O bei 60 °C mit 10 M NaOH gelöst, nach Abkühlen auf RT 27,6 g NaH₂PO₄ x 1 H₂O 100 mM, 4 ml 25% Glutaraldehyd, 333 ml Pikrinsäure, auf 2 l mit A. dest. aufgefüllt, pH 7,4) perfundiert. Für Immunfluoreszenz, wurde eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung als Fixiermittel verwendet (4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4). Gehirne, Nieren und Leber wurden entnommen und in der Fixierlösung mindestens 1 Stunde nachfixiert. Das Gehirn wurde in die Bereiche „Bulbus olfactorius, Vorderhirn I; Vorderhirn II, Cerebellum und Hirnstamm“ geteilt. Anschließend wurden die Gewebe bis zur Sättigung mit 0,4 M Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer behandelt und mit 0,8 M Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer über Nacht bei RT gefriereschützt. Das Gewebe wurde schließlich bei -60 °C mit Hilfe von n-Hexan in Tissue Tec (auf einer Korkplatte) eingefroren. Die gefrorenen Blöckchen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2. Beschichtung von Objektträgern

Die Objektträger wurden einzeln in Schlitten gestellt und in der Spülmaschine im höchsten Waschgang gereinigt, getrocknet und über Nacht an der Luft abgedeckt nachgetrocknet. Zur Herstellung der Gelatinelösung wurden 15 g Gelatine und 1,76 g Kaliumchromosulfat-12-hydrat in 630 ml destilliertem H₂O durch Erwärmen auf 70 °C gelöst. Dann wurden 300 ml Ethanol (100%) und 70 ml Eisessig zugesetzt und die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert. Die vorgereinigten Objektträger wurden mit den Schlitten in die warme Gelatinelösung für je 3 Minuten eingetaucht, für 2 bis 3 Stunden an der Luft vorgetrocknet (staubfrei, zum ablaufen schräg gestellt) und dann 24 Stunden im Wärmeschrank bei 60 °C nachgetrocknet.

2.5.3. Immunzytochemie im lichtmikroskopischen Bereich

Für die immunzytochemischen Versuche wurden am Gefriermikrotom von mir 20 bis 25 µm dicke Gewebeschnitte vom Rattenhirn angefertigt und mit Hilfe eines Pinsels in mit PBS gefüllte 24-Well Gewebekulturplatten übertragen. Anschließend wurden die Schnitte für mindestens 20 Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit aufeinanderfolgenden Inkubationslösungen behandelt, wobei mit einem Volumen von 500 µl inkubiert und mit einem Volumen von ca. 1000 µl gewaschen wurde. Die Inkubationen über Nacht erfolgten bei 4 °C auf einem Schüttler.

ABC-DAB/Nickel-Methode

Die Schnitte wurden für 15 Minuten mit 1% Natriumborhydrid in PBS behandelt, dann mit PBS (3x 15 Minuten) gewaschen und in einem weiteren Schritt für 30 Minuten in einer Lösung aus 10% NGS, 0,3% Triton X-100 und 0,05% Phenylhydrazin in PBS inkubiert. Anschließend wurde der Erstantikörper (anti-Arg1-Antikörper, 1:500) in 10% NGS, 0,3% Triton X-100 ergänzt mit 0,1% Natriumazid in PBS verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in dieser Lösung inkubiert. Nach dem Waschen in PBS (20 und 40 Minuten) und einer weiteren Stunde in 0,2% Rinderserumalbumin mit PBS (PBS-A; 2 mg BSA/ml PBS), wurden die Schnitte mit sekundärem biotinyliertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (B-GaR; 1:2000 in PBS-A) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und mit dem Signalsystem, ein löslicher Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidlösung (ABC; Elite A und Elite B; je 1:1000 in PBS-A), über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (10,

20 und 30 Minuten), wurde die gewebegebundene Peroxidase mit einer DAB-Lösung (1,4 mM 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), 10 mM Imidazol in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,4) visualisiert. Durch Zugabe von 3% Ammoniumnickelsulfat und 25 µl 0,03% H₂O₂ pro Well (500 µl DAB-Lösung pro Well) wurde die Visualisierungsreaktion gestartet. Alle Schnitte wurden für 15 Minuten entwickelt. Die DAB-Lösung wurde durch PBS ausgetauscht und somit die Färbungsreaktion gestoppt. Die gefärbten Schnitte wurden danach auf mit Gelatine beschichtete Objektträger gezogen, dehydriert (Ethanolreihe; 70%, 90%, 96%, 100%, 100%, jeweils 3 Minuten), 2x kurz mit Xylol behandelt und in Entellan eingebettet.

Negativkontrolle

Für Negativkontrollen wurden die Erstantikörper weggelassen. Unter diesen Bedingungen wurde dann keine Färbung erkannt. Zur besseren Überprüfung der Bindungsspezifität des Erstantikörpers wurden als Negativkontrolle vor der Inkubation auf Rattenhirnschnitten der Erstantikörper mit dem spezifischen Antigen inkubiert. Die entsprechende Konzentration des Antikörpers wurde zuvor in einem kompetitiven ELISA ermittelt. Mit 40 µg/ml wurde die immunzytochemische Markierung von Hirnschnitten komplett blockiert.

2.5.4. Färbung mit Kresylviolett

Um die Zytoarchitektur der Rattenhirnschnitte darzustellen, macht man sich hier die positive Ladung des Anilinfarbstoffs Kresylviolett zu Nutze. Basophile Strukturen, wie Zellkerne oder RNA (Nissl-Körperchen), werden violett gefärbt. Die Objektträger mit den aufgezogenen und luftgetrockneten Schnitten wurden über Nacht mit 70% Ethanol behandelt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in Aqua destillatum für 2 Minuten gewaschen und anschließend für 30 Minuten in einer Lösung aus 0,2% Kresylviolett-Acetat in 20 mM Essigsäure (pH 4,5) inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder in Aqua destillatum (2 Minuten) gewaschen, in 70% Ethanol (max. 5 Minuten) differenziert und entwässert. Nach der Dehydratisierung (Ethanolreihe; 70%, 90%, 96%, 100%, 100%, jeweils 3 Minuten) und zweimaligen kurzen Xylol-Behandlung wurden die Schnitte in Entellan eingebettet.

2.5.5. Immunzytochemie im elektronenmikroskopischen Bereich

Pre-embedding Immunzytochemie

Vor der Einbettung mit dem Kunstharz Araldit erfolgte als erstes die immunzytochemische Markierungsreaktion (Kapitel 2.5.3.). Um die Ultrastruktur des Gewebes zu erhalten, gibt es (folgende) Abweichungen im Versuchsprotokoll für die Lichtmikroskopie: im zweiten Versuchsschritt wurden die Schnitte, um Aldehydgruppen zu reduzieren, nur mit 0,1% Natriumborhydrid (in PBS, 15 Minuten) behandelt. Die darauffolgende Vorinkubation wurde nur mit 0,05 bis 0,1% Triton und die Inkubation des Erstantikörpers ohne Triton durchgeführt. Schließlich wurde bei der Farbentwicklung nur 0,03% H₂O₂ dazu pipettiert und Ammoniumnickelsulfat weggelassen.

Einbettung in Araldit

Nach der Visualisierung mit Immunperoxidase wurden die Schnitte in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) überführt, mit 1% Osmiumtetroxid in 0,1 M PB (pH 7.4) für 30 Minuten nachfixiert und für 1 Stunde in PB gewaschen. Danach wurden die Schnitte durch abgestuftes Ethanol (EtOH, 50%, 70%; je 2x 5 Minuten) entwässert und im Dunkeln für 30 Minuten mit 2% Uranylacetat in 70% EtOH behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in einer Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, je 2x 5 Minuten; 100% 3x 5 Minuten) weiter entwässert. Die Schnitte wurden danach für 2x 10 Minuten mit Propylenoxid behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in ein Gemisch aus Araldit/ Dodecenylnsuccinicanhydrid (DDSA, Araldithärter) und Propylenoxid gebracht (für das Verhältnis 1:1; 11 g Araldit/DDSA (30 g Araldit und 24 g DDSA), 10 ml Propylenoxid) und jeweils nach Verhältnis (20 Minuten für 2:1; 30 Minuten für 1:1 und 30 Minuten für 1:2) inkubiert. Die Schnitte wurden dann in Araldit-Einbettungslösung (100 g Araldit Lösung mit 2 ml DMP30) 30 Minuten im Exicator inkubiert und dann nach nochmaligem Wechsel der Araldit-Einbettungslösung über Nacht bei RT in der Araldit-Einbettungslösung (im Exicator) belassen. Zum Schluss wurden die Schnitte in ihrer Araldit-Einbettungslösung auf silanisierte Objektträger überführt, mit einem weiteren Objektträger abgedeckt und unter leichtem Druck für mindestens 12 Stunden bei 60 °C im Brutschrank auspolymert.

Vorbereitung von Semidünn- und Ultradünnschnitten

Die Bereiche von Interesse wurden lichtmikroskopisch identifiziert, aus dem eingebetteten Abschnitt geschnitten und auf einen Kunststoff-Träger geklebt (mit Zweikomponentenkleber).

Die Semidünnschnitte (300 bis 500 nm) und Ultradünnschnitte (60 bis 70 nm) wurden unter Verwendung eines Diamantmessers und eines Ultramikrotoms geschnitten. Die Semidünnschnitte wurden getrocknet und für maximal 1 Minute bei 70 °C mit Toluidinblaulösung (1% Toluidinblau, 40% Saccharose, 1% di-Natrium-Tetraborat in bidest. Wasser, pH 9,3) auf einem Objektträger angefärbt. Die Ultradünnschnitte wurden auf mit 0,75% PIOLOFORM® in Chloroform befilmten 300-Mesh-Nickel- oder Kupfergittern aufgenommen.

Die dünnen Silberschnitte wurden mit 2% Uranylacetat in 70% Ethanol und Bleicitrat (H₂O 5 ml, Bleinitrat 133 mg, Natriumcitrat 200 mg, Natriumhydroxid 10 N 80 µl, nach Reynolds et al.) kontrastiert und mit einem Zeiss-TEM 900 Elektronenmikroskop, ausgestattet mit einer Pro Scan 1K Frametransfer Kamera, analysiert.

Lichtmikroskopisch wurden die Regionen identifiziert, die für die weitere Elektronenmikroskopie interessant waren. Diese wurden dann aus dem eingebetteten Schnitt ausgeschnitten und mit Zweikomponentenkleber auf einen Kunststoff-Träger geklebt. Dann wurden an einem Ultramikrotom mit Hilfe eines Diamantmessers die Semidünnschnitte (300 bis 500 nm) und Ultradünnschnitte (60 bis 70 nm) angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden getrocknet und für maximal 1 Minute bei 70 °C mit Toluidinblaulösung (1% Toluidinblau, 40% Saccharose, 1% di-Natrium-Tetraborat in bidest. Wasser, pH 9,3) auf einem Objektträger angefärbt. Die Ultradünnschnitte wurden auf mit 0,75% PIOLOFORM® in Chloroform befilmten 300-Mesh-Nickel- oder Kupfergittern aufgenommen. Die dünnen Silberschnitte wurden mit 2% Uranylacetat in 70% Ethanol und Bleicitrat (H₂O 5 ml, Bleinitrat 133 mg, Natriumcitrat 200 mg, Natriumhydroxid 10 N 80 µl) kontrastiert und mit einem Zeiss-TEM 900 Elektronenmikroskop, ausgestattet mit einer Pro Scan 1K Frametransfer Kamera, analysiert.

2.5.6. Immunfluoreszenz-Zytochemie

Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

Anfangs wurden die Schnitte in PBS gewaschen (2x 15 Minuten), dann für 15 Minuten mit 1% Natriumborhydrid in PBS behandelt und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einer Vorinkubationslösung, aus 10% Pferdeserum (normal horse serum, NHS) und 0,3% Triton X-100 (10% NHS, 0,3% Triton in PBS) inkubiert. Der Erstantikörper (anti-Arg1-Antikörper) und die anderen drei Antikörper (Mouse-anti-Parvalbumin; 1:5000, Mouse-anti-Calbindin; 1:5000, Goat-anti-Calretinin; 1:2500) wurden gleichzeitig auf die Schnitte aufgebracht und für mindestens 24 Stunden bei 4 °C in der Inkubationslösung (10% NHS, 0,3% Triton X-100 in PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS (20 und 40 Minuten) wurden die Schnitte für 1 Stunde mit 0,2% PBS-A (2 mg BSA/ml PBS) behandelt. Anschließend wurden für mindestens 3 Stunden bei RT sekundäre Fluorochrom-markierte Antikörper (Cy3-DaR, 1:250; Cy2-DaG, 1:200; Cy2-DaM; 1:250 in PBS-A) aufgebracht.

Die Schnitte wurden mehrfach in PBS gewaschen, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht und kurz luftgetrocknet. Nach einer kurzen Entwässerung in Ethanol (100%, 100%, jeweils nur kurz auf und ab) und einer Behandlung mit Xylol (2x kurz) wurden die Schnitte mit DPX eingedeckt. Die Schnitte wurden anschließend unter dem Leica DM-LB Mikroskop (mit digitaler Leica DFC490 Kamera) betrachtet.

Immunfluoreszenz transfizierter Zellen

Für Immunfluoreszenzmarkierung von transfizierten Zellen (Kap. 2.5.7.) wurden die Zellen anfangs in PBS gewaschen (2x 15 Minuten), für 15 Minuten mit 1% Natriumborhydrid behandelt und erneut dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden mit Blockierungslösung (10% NHS und 0,3% Triton X-100, in PBS) eine halbe Stunde bei RT vorinkubiert. Danach erfolgte bei 4 °C über Nacht die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten Erstantikörper (anti-Arg1-Antikörper; 1:200). Am nächsten Tag wurden die Zellen erst dreimal in PBS gewaschen und zusätzlich für 1 Stunde mit PBS-A behandelt, bevor sie in der Dunkelheit mit sekundären Esel-anti-Kaninchen-Cy3 Antikörper (Cy3-DaR; 1:100) verdünnt in 2% BSA in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Nach wiederholtem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen kurz luftgetrocknet und nach Entwässerung in Ethanol (100%, 100%, jeweils nur kurz auf und ab) und einer Behandlung mit Xylol (2x kurz) auf Glasobjektträgern mit DPX eingedeckt. Die

Zellen wurden anschließend unter dem Leica DM-LB Mikroskop (mit digitaler Leica DFC490 Kamera) betrachtet.

2.5.7. Expression von Arg1 in HeLa-Zellen

Vorbemerkungen

Die transfizierten Zellen wurden freundlicherweise im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Frau Britta Laube, Max-Planck-Institut Berlin, Institut für Infektionsbiologie erstellt.

Durchführung

HeLa-Zellen sind Zervixkarzinom-Zellen. Den Namen erhielten sie nach den Initialien der Spenderin, Henrietta Lacks. Es sind die ersten humanen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie entstand.

Die HeLa-Zellen wurden für die Immunfluoreszenz auf 24-Well-Platten, die runde 13 mm Deckgläschen enthielten (für den Western Blot direkt in 6-Well-Schalen), in 5% CO₂ in RPMI 1640 Medium (ein Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entwickelt wurde, enthält ein Hydrogencarbonat-Puffersystem) mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert. Die Zellen wurden vorübergehend unter Verwendung von Lipofectamine 2000 transfiziert (Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt). Gemäß den Anweisungen des Herstellers, wurden sie mit 3 µl Lipofectin und 1 µg Plasmid-DNA, welche die für die Ratten-Arg1 kodierende full length cDNA (clone IRBPp993H1036D, imaGenes) enthielt, transfiziert. Die cDNA wurde bereits vorher in den Expressionsvektor (pExpress-1) kloniert. Schließlich wurden 48 Stunden nach der Transfektion die Zellen entweder homogenisiert und für Western-Blotting vorbereitet oder in PBS gewaschen. Nach dem Waschen in PBS folgte anschließend die Fixierung in 4% phosphatgepuffertem Paraformaldehyd und wiederholtes Waschen in PBS für Immunzytochemie.

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung eines spezifischen Antikörpers gegen Arginase 1

Zur Expression der Arginase-Isoformen liegen für die Ratte bisher nur wenige Daten aus in situ Hybridisierung oder Immunzytochemie vor (Braissant et al. 1999; Choi et al. 2011). Diese zeigen, dass die beiden Arginase-Isoformen in verschiedenen Organen in unterschiedlicher Verteilung vorkommen. Zur Erhebung dieser Daten wurden spezifische kommerzielle Antikörper verwendet. Um weitere Erkenntnisse über die Verteilung der Arginase im Rattengehirn zu erhalten, wurde der für die vorliegenden Untersuchungen verwendete, polyklonale, monospezifische Antikörper gegen Arginase 1 (Arg1) hergestellt und charakterisiert (Peters, Berger et al., 2013).

3.1.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen

Die Aminosäuresequenzen von Arg1 und Arg2 weisen bei der Ratte eine relativ hohe Übereinstimmung von ca. 60% über eine Sequenzlänge von 313 Aminosäuren auf (Morris et al., 1997; Mori, 2007). Es war daher zu erwarten, dass ein Arginase-Antikörper beide Arginase-Isoformen erkennt. Für die Generierung eines solchen pan-Arginase-Antikörpers wurde das Arg1-Protein ausgewählt. Um einen Antikörper gegen Arginase (= Arg1/Arg2) zu gewinnen, der nicht mit anderen Enzymen des Polyamin-Stoffwechsels kreuzreagiert, wurde zunächst ein Teilbereich aus der Arg1-Sequenz ausgewählt, der mit anderen Proteinen möglichst wenig Homologien aufweist. Zu den Enzymen der Ureohydrolase-Familie gehört neben Arg1 und Arg2 unter anderem auch Agmatinase, ein Enzym des alternativen Polyamin-Synthesewegs. Die Sequenzübereinstimmung von Arg1 mit Agmatinase beträgt jedoch nur 23% und lässt keine Kreuzreaktivität erwarten. Nach Abschluss der Datenbankrecherchen (BLAST) unter Verwendung der Arg1-Sequenz aus der Ratte wurde schließlich eine 221 Aminosäuren lange C-terminale Sequenz ausgewählt (Abb. 5). Ein Alignment zwischen dem zur Immunisierung verwendeten Arg1-Sequenzabschnitt und der Arg2-Proteinsequenz ergab eine 65%ige Sequenzübereinstimmung und das putative Vorliegen gemeinsamer Epitope (Abb. 5). Nach Datenbankrecherchen (BLAST) ergaben sich zur Arg1 keine näher verwandten Proteine als Arg2 (61% Übereinstimmung) und Agmatinase. Ein Alignment mit

Agmatinase ergab nur eine 23%ige Sequenzübereinstimmung und keine gemeinsamen Epitope.

3.1.2. Entfernung der IgM Antikörper durch Gelfiltration

IgM-Antikörper können reversibel Epitope blockieren und die Bindung von IgG-Antikörpern verhindern, was sich nachteilig auf die immunzytochemischen Versuchsergebnisse auswirken kann. Daher müssen IgM-Antikörper entfernt werden. Dazu wurde das Rohserum auf eine Superdex-S200-Säule geladen, die die Moleküle nach Größe trennt. Eine photometrisch (280 nm) gemessene Proteinlinie zeigte, neben dem typischen IgG-Gipfel, einen früheren deutlichen IgM-Gipfel (nicht abgebildet). Eine ELISA-Messung der Immunreaktivität gegen das Antigen 6HisTR-Arg1 führte zu den Fraktionen mit der höchsten IgG-Konzentration (nicht abgebildet). Basierend auf den beiden Messungen wurden diese Fraktionen zur weiteren Reinigung gesammelt (S-200-Pool).

3.1.3. Affinitätsreinigung der Antikörper

Der S-200-Pool enthielt noch Aktivität gegen das Trägerprotein GST sowie eine, trotz der geringen Sequenzhomologie, mögliche Kreuzreaktivität gegen das entfernt verwandte Enzym Agmatinase (Abb. 6). Daher wurden der eigentlichen Affinitätsreinigung des Antikörpers zunächst die Entfernung von Kreuzreaktivitäten gegen GST und Agmatinase vorangestellt. Die Verwendung von Thioredoxin-Fusionsproteinen anstelle von GST-Fusionsproteinen minimiert die unerwünschte Mitaufreinigung von Antikörpern gegen das für die Immunisierung verwendete Trägerprotein GST. Der anschließende ELISA bestätigte die erfolgreiche Aufreinigung.

3.1.4. ELISA zur Testung der Kreuzreaktivität

Der ELISA dient der Überprüfung der Spezifität des gereinigten Antikörpers gegenüber dem Antigen Arginase. Der anti-Arg1-Antikörper erkennt beide adsorbierten rekombinaten Fusionsproteine (GST-Arg1 & 6HisTR-Arg1). Die gemessenen Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, welche die höchste Reaktivität für GST-Arg1 und den niedrigsten Messwert für Thioredoxin auswiesen. Im Vergleich dazu lagen die Messwerte für die beiden Agmatinase-Fusionsproteine auf fast identisch niedrigem Niveau, so

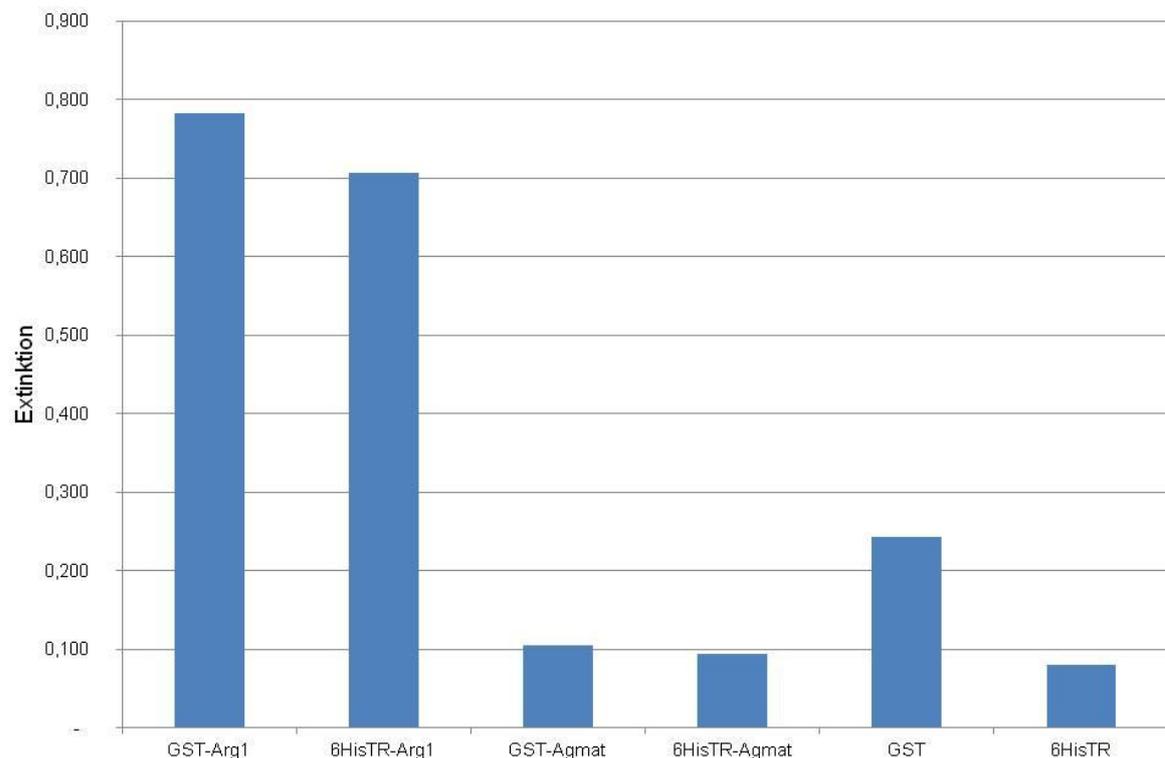


Abb. 6 : ELISA zur Testung der Kreuzreaktivität nach Affinitätsreinigung

Die ELISA-Platte wurde mit verschiedenen Fusionsproteinen aus der Arginase-Familie und den Fusionsanteilen GST und Thio-redoxin beschichtet. Während beide Arginase-Konstrukte starke Immunreaktivität zeigten, führten beide Agmatinasefusionsproteine (GST-Agmat; 6HisTR-Agmat) zu ähnlich niedrigen Messwerten wie das Trägerprotein Thioeredoxin. Gegen reines GST-Protein bestand noch eine Restaktivität, die sich jedoch im Vergleich zum Wert von GST-Agmat relativiert.

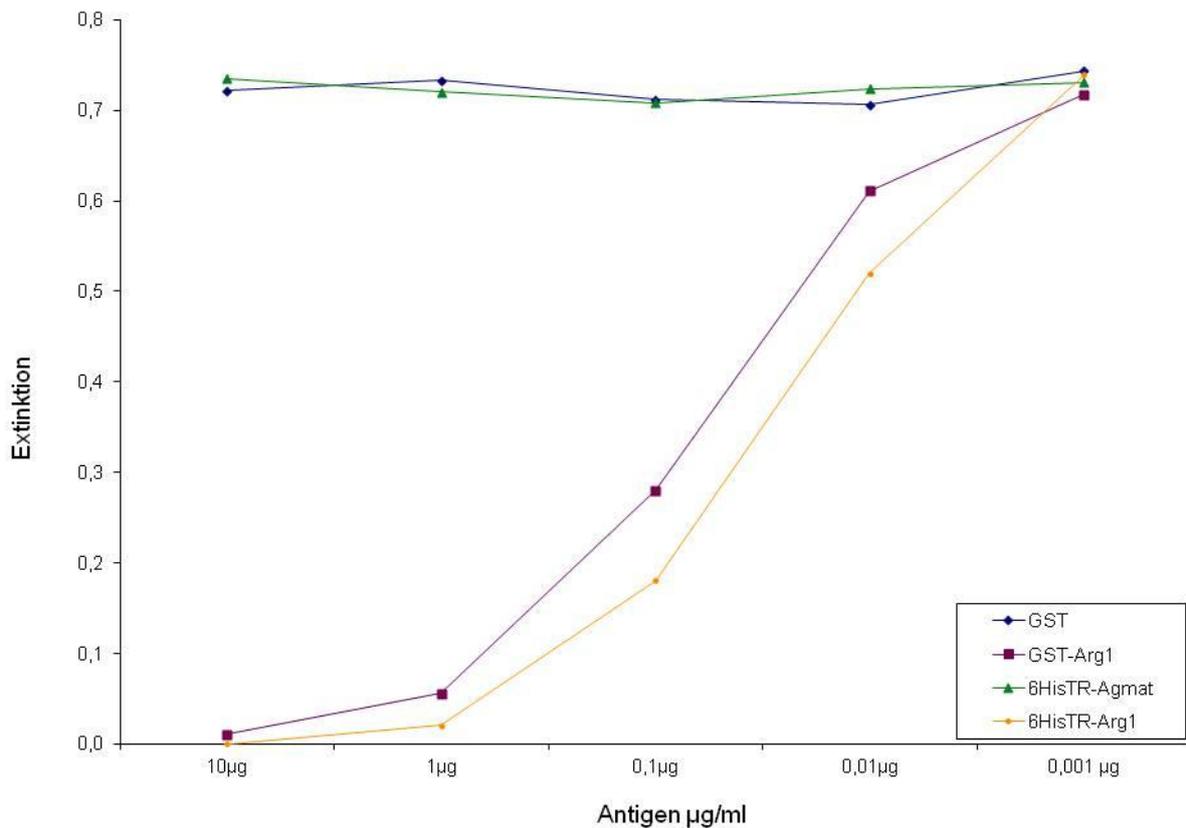
Verdünnung: 1:3000

dass eine Kreuzreaktivität mit Agmatinase ausgeschlossen werden kann. Lediglich eine leichte Kreuzreaktivität gegen GST war noch nachweisbar, wobei beachtet werden muss, dass bei Beschichtung mit der gleichen Proteinkonzentration der GST-Proteinanteil bei der Arg1- und Agmatinase-Beschichtung deutlich geringer ausfällt. Dies zeigt sich auch in dem sehr geringen Messwert für Agmatinase-GST (GST-Agmat).

3.2. Charakterisierung des gereinigten Antikörpers

3.2.1. Kompetitiver ELISA

Zur weiteren Charakterisierung eines gereinigten Antikörpers und um die Spezifität für die entsprechenden primären Sequenzen zu zeigen, eignet sich der kompetitive ELISA (Abb. 7). Der anti-Arg1-Antikörper erkennt beide nativen rekombinaten Fusionsproteine.

**Abb. 7 : Kompetitiver ELISA**

Die ELISA-Platte wurde mit je 5 $\mu\text{g/ml}$ 6HisTR-Arg1 beschichtet. Nach Vorinkubation mit den jeweiligen Testproteinen sinkt nur bei Verwendung der beiden Arginasekonstrukte die Aktivität des Antikörpers rasch ab. Die Vorinkubation mit GST und 6HisTR-Agmat konnten die Bindungsfähigkeit des Antikörpers dagegen nicht beeinflussen.

Bei beiden Arg1-Fusionsproteinen zeigte sich der typische steile, sigmoidale Abfall der spezifischen Aktivität des gereinigten Antikörpers. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ Protein war die Aktivität bereits zu einem großen Teil blockiert und bei Einsatz von 10 $\mu\text{g/ml}$ Protein schließlich gänzlich unterdrückt. Dagegen konnten weder GST noch 6HisTR-Agmat die Reaktivität des Antikörpers beeinflussen. Somit belegen die mit Hilfe der gezeigten ELISA-Tests gewonnenen Ergebnisse zusätzlich die Spezifität des gereinigten Antikörpers in diesem biochemischen Testansatz.

3.2.2. Western-Blot-Analysen

Western-Blot-Analyse mit rekombinanten Fusionsproteinen

Die Western-Blot-Analyse mit rekombinanten Fusionsproteinen erfolgte zum Nachweis der Spezifität des anti-Arg1-Antikörpers gegen die denaturierten rekombinanten Thioredoxin- und GST-Fusionsproteine. Die Ergebnisse bestätigen, dass der Antikörper die verwandten 6HisTR- Arg1 und GST-Arg1 Fusionsproteine markiert (Abb. 8, A Bahn 1+2). Vom Antikörper wurden relativ diffuse Banden entsprechend den errechneten Molekulargewichten von GST-Arg1 (49,2 kDa) und 6HisTR-Arg1 (43,2 kDa) markiert. Desweiteren konnte mit einer 10 µg/ml Vorinkubation des rekombinanten 6HisTR-Arg1-Proteins die Bindung des anti-Arg1-Antikörpers komplett blockiert werden (Abb. 8, C Bahn 7). Die Bindung an das GST- Arg1-Fusionsprotein wurde nur ansatzweise blockiert (Abb. 8, C Bahn 6). Diese bestehende Bande wird durch Antikörper gegen den bakteriellen GST-Fusionsanteil hervorgerufen, der nach wie vor in dem aufgereinigten Serum enthalten ist.

Western-Blot-Analyse von Rattenhomogenaten und -zytosol

Die Western-Blot-Analyse von Rattenhomogenaten und -zytosol erfolgte zum Nachweis der Spezifität des anti-Arg1-Antikörpers gegen die denaturierten nativen Proteine. Die Ergebnisse zeigen, indem jeweils nur eine spezifische Bande markiert ist, dass der anti-Arg1-Antikörper das eigentliche Arg1-Protein spezifisch markiert und Kreuzreaktivitäten mit anderen zellulären Proteinen ausgeschlossen werden können. In Übereinstimmung mit dem errechneten Molekulargewicht des nativen Arg1-Proteins von 35 kDa, zeigte sich bei der Rattenleber eine Bande bei etwa 37 kDa (Abb. 8, A Bahn 3). In Cortexhomogenaten (Abb. 8, B Bahn 4) und dem Zytosol der Ratte (Abb. 8, B Bahn 5) sind Banden von ungefähr 80 kDa ermittelt worden. Die Größe von 80 kDa resultiert vermutlich aus einer über eine kovalente Bindung erfolgten Dimerisierung des Proteins. Die Vorinkubation des Antikörpers mit 6HisTR-Arg1-Fusionsprotein (10 µg/ml Bahn 8, 40 µg/ml Bahn 9-10) führte zu einer nahezu kompletten Blockierung des Immunsignals. Das Verschwinden dieser Banden belegt die Spezifität des Antikörpers deutlich.

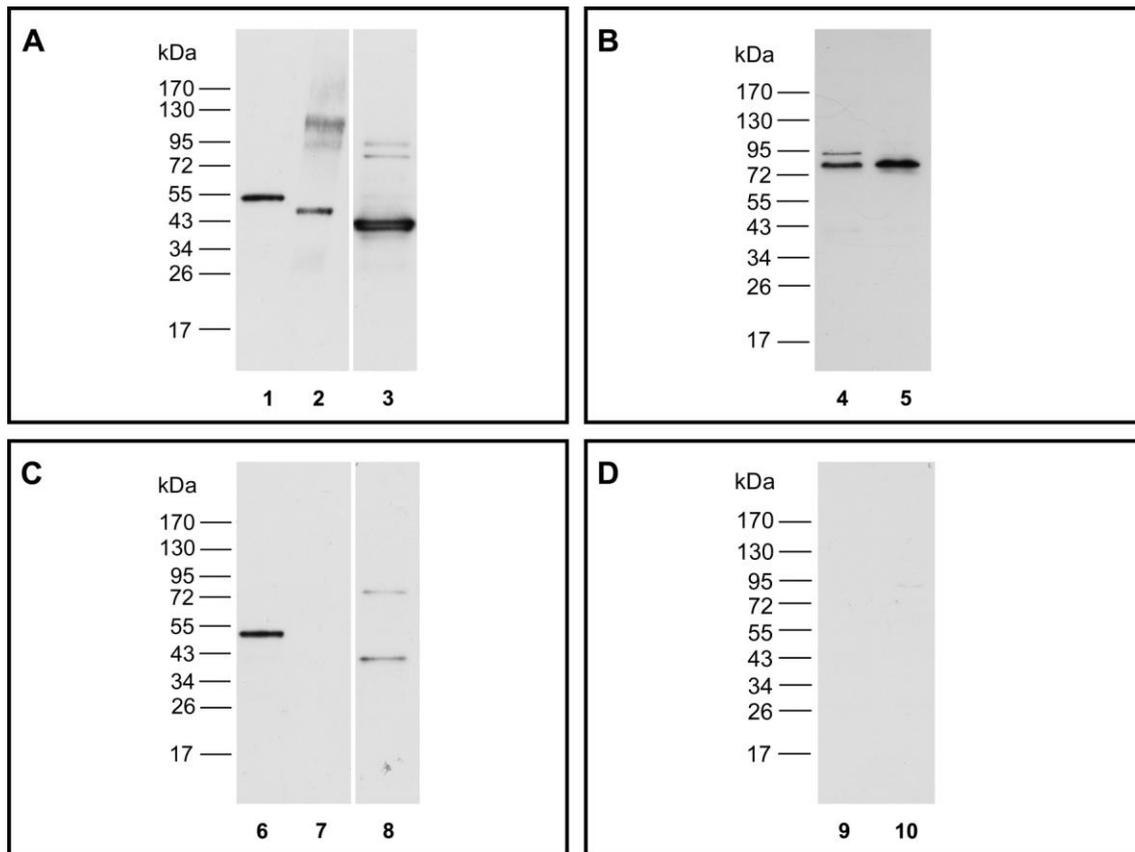


Abb. 8 : Spezifität des anti-Arg1-Antikörpers

Der anti-Arg1-Antikörper erkennt sowohl das in Bakterien exprimierte GST-Arg1-Fusionsprotein (A, Bahn 1, 49,2 kDa) als auch das 6HisTR-Arg1-Fusionsprotein (A, Bahn 2, 43,2 kDa). Eine starke, bei 37 kDa liegende Bande ist erkennbar bei Rattenleberhomogenaten (A, Bahn 3). In Cortexhomogenaten (B, Bahn 4) und dem Zytosol der Ratte (B, Bahn 5) sind Banden von ungefähr 80 kDa ermittelt worden. Die Vorinkubation des Antikörpers mit 6HisTR-Arg1-Fusionsprotein (10 µg/ml Bahn 6-8, 40 µg/ml Bahn 9-10) führte zu einer nahezu kompletten Blockierung des Immunsignals. Bahnen 1 und 6, GST-Arg1-Fusionsprotein (25 ng); Bahnen 2 und 7, 6HisTR-Arg1-Fusionsprotein (25 ng); Bahnen 3 und 8, Rattenleberhomogenate (25 µg); Bahnen 4 und 9, Cortex cerebri-Homogenate der Ratte (40 µg); Bahnen 5 und 10, Zytosol des Cortex cerebri der Ratte.

Western-Blot-Analyse von transfizierten Zellen

Die Western-Blot-Analyse von transfizierten Zellen erfolgte zum Nachweis der Spezifität des anti-Arg1-Antikörpers gegen das vollständige Protein in Homogenaten von HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen, welche mit einem Ratten-Arg1 kodierenden full length cDNA-Klon transfiziert wurden (Abb. 9, Bahn 2), präsentieren nach Zugabe des anti-Arg1-Antikörpers ebenfalls eine Bande im zu erwartenden Bereich bei 37 kDa. Eine Bande von gleicher Höhe ist im Rattenleberhomogenat vergleichsweise nachweisbar (Abb. 9, Bahn 3). In der Leber ist das Vorkommen von Arg1 am größten. Die nicht transfizierten Zellen zeigen hingegen keine Immunreaktivität (Abb. 9, Bande 1). Wird der anti-Arg1-Antikörper mit 10 µg/ml 6HisTR-Arg1, dem gereinigten Fusionsprotein, vorinkubiert,

dann führt dies annähernd zum Verschwinden des Immunsignals, womit die Spezifität des Signals bestätigt ist (Abb. 9, Bahn 4-6).

3.2.3. Immunzytochemie an transfizierten Zellen

Um zu zeigen, dass der anti-Arg1-Antikörper Arg auch in fixiertem Gewebe markiert, wurde die DNA des Proteins (Ratten-Arg1 kodierende full length cDNA) in He-La-Zellen transfiziert, die das Protein in der Gewebekultur normalerweise nicht exprimieren. Immunzytochemisch konnten mit dem anti-Arg1-Antikörper in fixierten, transfizierten HeLa-Zellen immunpositives Material (Arginase-Protein) im Zytoplasma nachgewiesen werden. Bei diesen transfizierten Zellen wurde eine kräftige Markierung entweder als diffuse oder fleckige zytoplasmatische Immunreaktivität (Abb. 9, C Pfeilköpfe) nachgewiesen. Nicht-transfizierte HeLa-Zellen zeigten keine immunzytochemische Markierung (Abb. 9, D). Dieses Experiment beweist, dass der Antikörper das Protein in voller Länge in einer fixierten zellulären Umgebung erkennt. Somit eignet sich der Antikörper für Immunzytochemie auf Gehirnschnitten.

3.2.4. Charakterisierung des anti-Arg1-Antikörpers durch Immunzytochemie an Arginase-reichen Geweben

Als Positivkontrolle wurden Kryostatschnitte von Rattennieren und Rattenlebern für immunzytochemische Markierungsversuche mit dem anti-Arg1-Antikörper benutzt (Abb. 10). Arg1 wird besonders stark in der Leber exprimiert. Arg2 wird dagegen in Dünndarm und Niere stark exprimiert (Yu et al., 2003). Sowohl die Nieren- als auch die Leberschnitte der Ratten zeigten ein starkes Immunsignal. In Übereinstimmung mit bisherigen Daten (Choi, et al. 2012; Miyanaka, et al. 1998; Ozaki, et al. 1999; Yu et al., 2003), markierte der anti-Arg1-Antikörper das Antigen in den periportalen Hepatozyten der Leber. Es wurde keine Expression in den perizentralen Hepatozyten beobachtet. Vor allem die Markstrahlen der Niere enthalten Arginase (Abb. 10; gestrichelter Kasten in D). Diese Ergebnisse zeigen, dass der anti-Arg1-Antikörper Arg1 und Arg2 detektiert. Dies entspricht der Erwartung, dass der anti-Arg1-Antikörper, aufgrund der hohen Homologie der Aminosäuresequenzen beider Arginase-Isoenzyme, als pan-Arginase-Antikörper fungiert. Somit kann der anti-Arg1-Antikörper als pan-Arginase-Antikörper die Lokalisierung der Arginase, nicht isoformenspezifisch, im Rattengehirn nachweisen.

3.2.5. Negativkontrollen an immunzytochemisch gefärbten Schnitten

Im ELISA und Western Blot wurde die Monospezifität des Antikörpers bereits dargestellt. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der Antikörper gegen das Protein in fixiertem Gewebe wurden immunzytochemische Kontrollen an Gefrierschnitten von Rattengehirnen durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde der Antikörper vor der Schnittinkubation zuvor mit dem spezifischen Antigen blockiert (Abb. 11). Eine komplette Blockierung des Immunsignals konnte mit einer 40 µg/ml Inkubation mit dem rekombinanten 6HisTR-Arg1-Protein erreicht werden. Da die Arginase eine weite Verbreitung im Gehirn zeigt, mit besonders hoher Expression in den Neuronen des Cortex cerebri (Abb. 11, C, D) und des Hippocampus (Abb. 11, E, F) wurde die spezifische Blockade besonders in diesen Regionen untersucht.

Der polyklonale, monospezifische anti-Arg1-Antikörper zeigt somit keine Kreuzreaktivitäten mit anderen zellulären Proteinen und eignet sich als Werkzeug für die Untersuchung der Lokalisation der Arginase im Rattengehirn sowie weiterführende Fragestellungen.

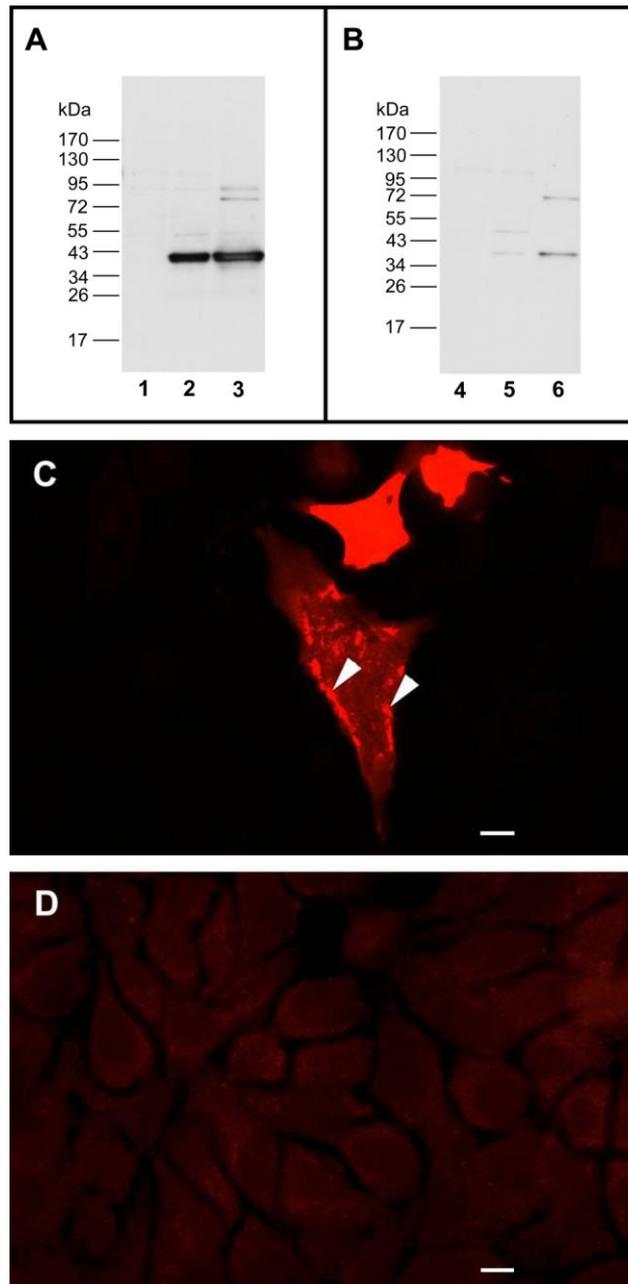


Abb. 9 : Der anti-Arg1-Antikörper erkennt spezifisch das Arginase 1-Protein in transfizierten HeLa-Zellen

A und B: In der Western-Blot-Analyse von transfizierten Zellen erkennt der anti-Arg1-Antikörper, auf der Höhe von 37 kDa eine spezifische Proteinbande (A, Bahn 2). Im Gegensatz dazu wurde in den untransfizierten Zellen kein Immunsignal beobachtet (A, Bahn 1). Eine Bande der gleichen Größe ist erkennbar bei Rattenleberhomogenaten, welche eine bekannte Quelle mit hohem Gehalt an Arg1 sind (A, Bahn 3). Die Vorinkubation des Antikörpers mit 10 µg/ml des 6HisTR-Arg1-Fusionsproteins führte zu einer annähernd kompletten Blockierung des Immunsignals (B, Bahnen 4-6).

Bahnen 1 und 4, untransfizierte HeLa-Zellen (15 µg); Bahnen 2 und 5, mit Arg1 full length cDNA-Klon transfizierte HeLa-Zellen (25 µg); Bahnen 3 und 6, Rattenleberhomogenate (25 µg)

C: Im Fluoreszenzmikroskop ist eine kräftige Markierung der transfizierten Zellen zu erkennen, die sich entweder als diffuse oder fleckige (Pfeilköpfe) zytoplasmatische Immunreaktivität äußert.

D: Die nicht-transfizierten HeLa-Zellen wurden nicht vom Antikörper markiert.

Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm in C und D.

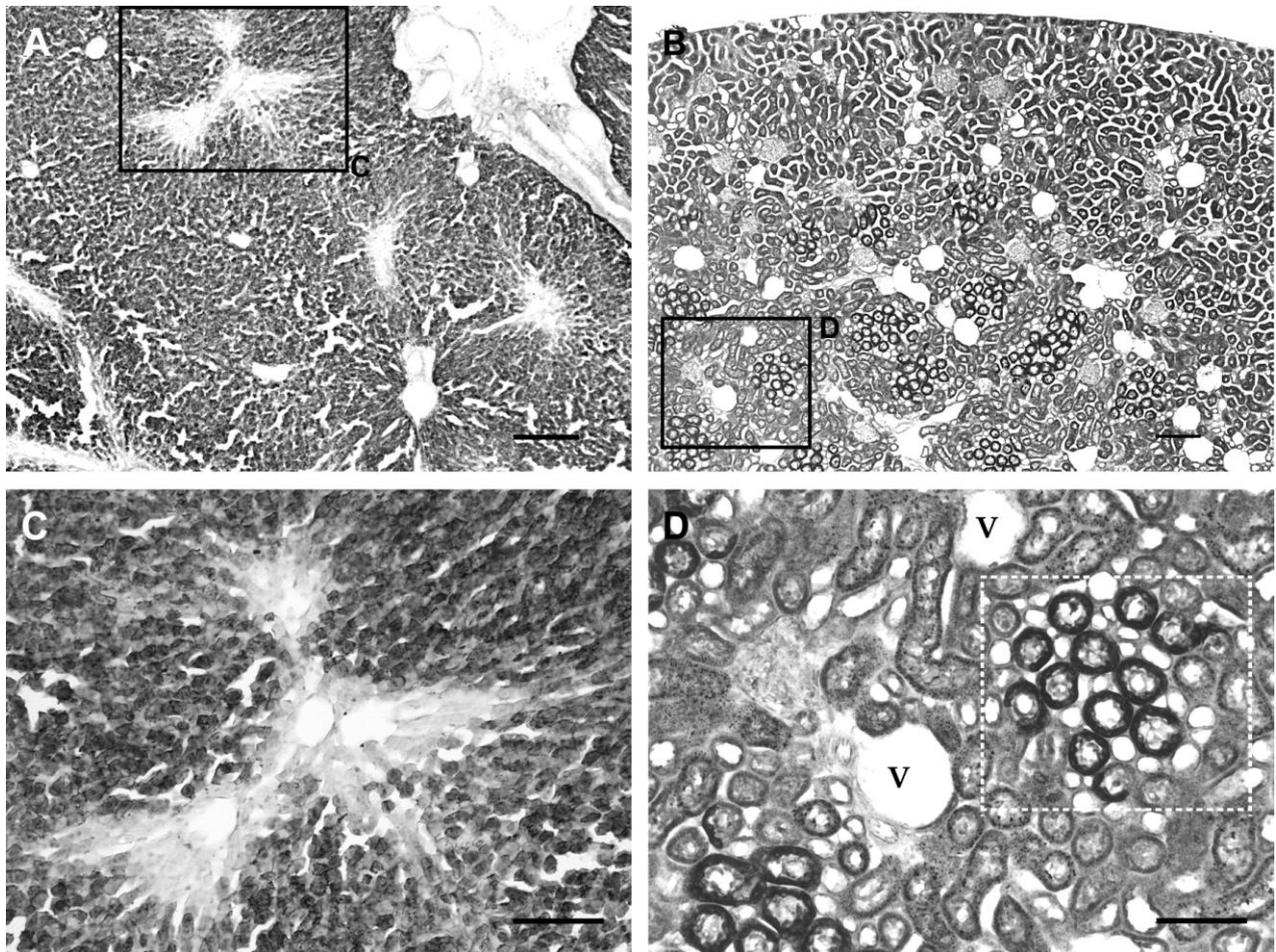


Abb. 10 : Immunzytochemische Expression der Arginase in Arginase-reichen Geweben

Die Rattenleber und -niere zeigen ein starkes positives Immunsignal (A und B). In der Leber detektiert der anti-Arg1-Antikörper Arginase in den periportal Hepatozyten. Die perizentralen Hepatozyten blieben unmarkiert (C). In der Niere wurde Arginase vor allem in den Markstrahlen nachgewiesen (gestrichelter Kasten in D).

V = Vene. Die Maßstabsbalken entsprechen 400 μm in A und B und 100 μm in C und D.

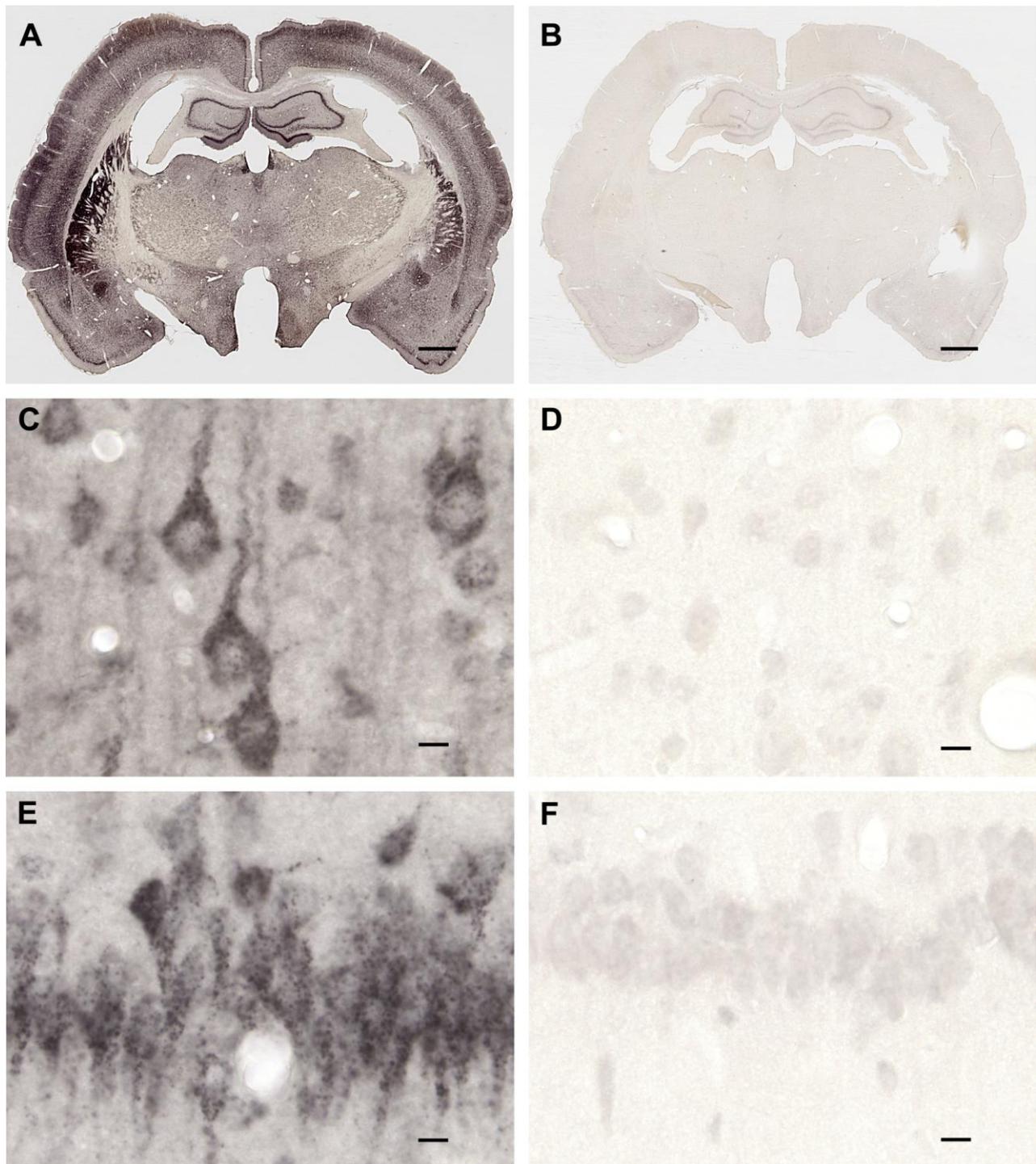


Abb. 11 : Blockade der Immunreaktivität des anti-Arg1-Antikörpers nach Vorinkubation mit 6HisTR-Arg1

A: Immunzytochemische Färbung eines Telencephalonschnittes der Ratte auf der Höhe von Bregma -2,30 mm.

B: Im benachbarten Schnitt wurde das Immunsignal durch Vorinkubation mit 40 µg/ml des rekombinanten 6HisTR-Arg1-Proteins komplett blockiert.

C: Bei hoher Vergrößerung zeigt sich das starke Immunsignal des anti-Arg1-Antikörpers in den Pyramidenzellen des Stratum pyramidale internum des Cortex cerebri. Die Inkubation mit 40 µg/ml 6HisTR-Arg1 führte zur kompletten Blockierung dieses Signals (D).

E und F: Die spezifische Blockade wurde auch in anderen Regionen, wie hier in den Neuronen der CA1-Region des Hippocampus beobachtet. Die Schnitte wurden bei gleichen Belichtungsverhältnissen aufgenommen und nicht bearbeitet. Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm in A und B und 20 µm in C - F.

3.3. Regionale und zelluläre Verteilung der Arginase im Rattengehirn

Nachdem Schnittserien von Rattengehirnen angefertigt und mit dem anti-Arg1-Antikörper immunzytochemisch gefärbt wurden, zeigte sich eine breite Verteilung des Arginase-Signals in allen untersuchten Neuronen und dem Neuropil des gesamten Rattengehirns. Davon eingeschlossen waren Neurone des Vorderhirns, Mittelhirns und Hinterhirns. Die Intensität des Arginase-Signals ist in den verschiedenen Gehirnarealen unterschiedlich stark ausgeprägt. Alle hier untersuchten Hirnregionen, die nicht im Folgenden abgebildet sind, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit im Vergleich zu bereits vorhandenen Literaturdaten im Diskussionsteil in Tabelle 3 dargestellt.

Expression der Arginase in ausgewählten Neuronen und Gliazellen

Die Expression der Arginase wird hier exemplarisch an ausgewählten Neuronen und Gliazellen beschrieben. Es zeigte sich, dass der Antikörper Arginase sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen detektiert wird. So wurden markierte Astrozyten beispielsweise in der Molekularschicht des Cortex cerebri (Abb. 12, D) nachgewiesen. Neben Astrozyten wurden auch Oligodendrozyten (Abb. 12, A-C) als weiteres Beispiel für das Vorkommen des Antikörpers in Gliazellen beobachtet. Hier ist das Immunsignal allerdings schwach ausgeprägt.

Im Cerebellum der Ratte sind verschiedene Neuronentypen der Rinde markiert (Abb. 12, E). Die Färbungsdichte ist dabei unterschiedlich. Bei hoher Vergrößerung wurde ein für den anti-Arg1-Antikörper typisches, punktförmiges Färbungsmuster beispielsweise in den Purkinjezellen (Abb. 12, F) und in den Korbzellen (Abb. 12, G) der Molekularschicht deutlich.

Diese Ergebnisse sprechen für eine zelltypübergreifende Lokalisierung der Arginase.

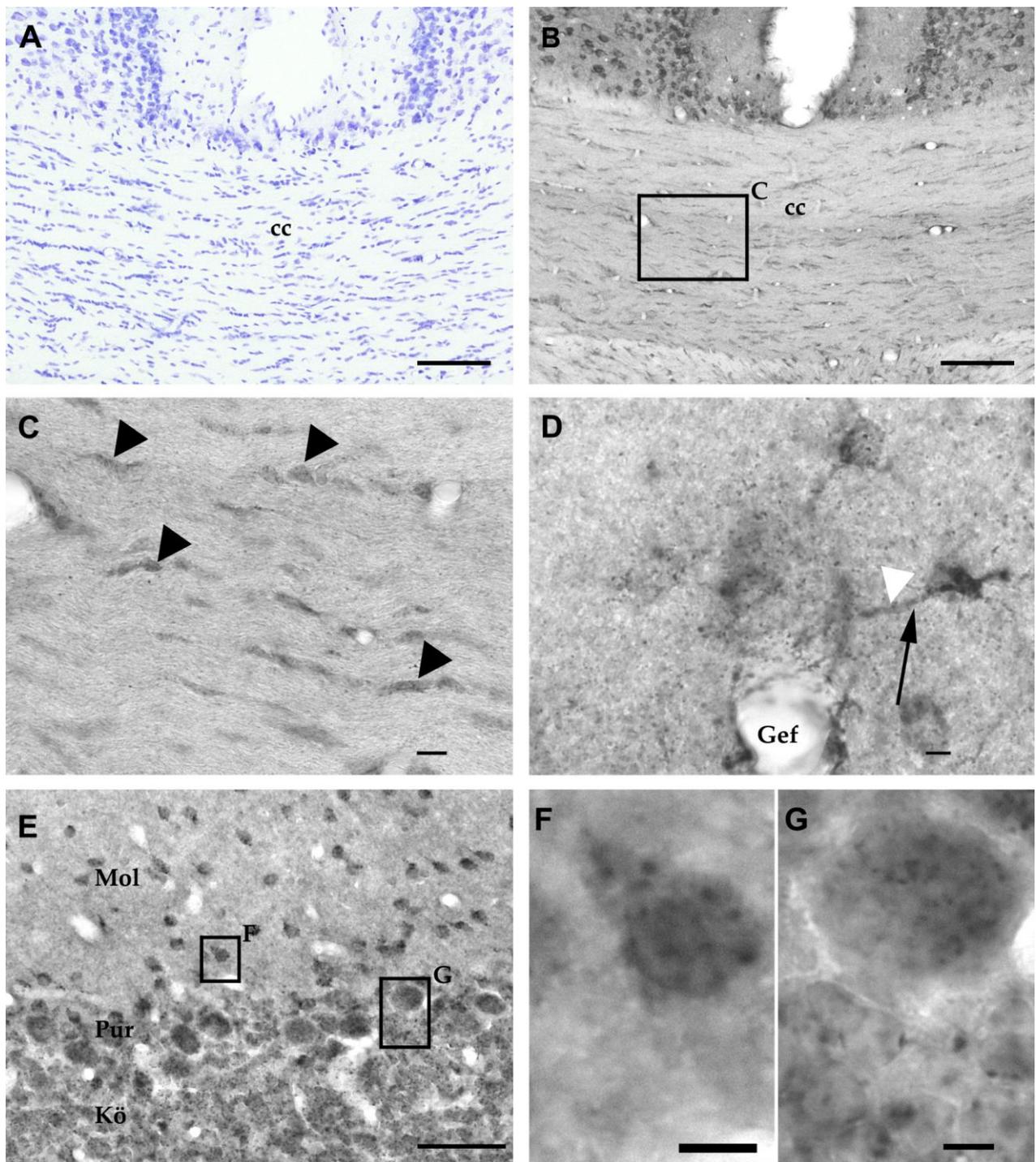


Abb. 12 : Arginase-Expression in Neuronen und Gliazellen der Ratte

A: Ausschnitt eines kresyl-violett gefärbten Schnittes, im Bereich des Corpus callosum auf Höhe ca. Bregma -3,14 mm.

B: Benachbarter Schnitt zu A. Immunzytochemisch markierte Strukturen im cc. Bei höherer Vergrößerung sind schwach markierte Oligodendrozyten zu erkennen (C, Pfeilköpfe).

D: In der Molekularschicht des Cortex cerebri wurden mit hoher Vergrößerung immunzytochemisch markierte Astrozyten identifiziert. Der Pfeil weist auf einen Astrozyten, wobei deutlich ein Ausläufer zu dem unteren Gefäß zu erkennen ist (Pfeilkopf).

E: Die Neurone des Kleinhirns sind in allen Schichten markiert. In der Detailaufnahme ist das typische punktförmige Immunsignal in Purkinjezellen (F) und Korbzellen (G) zu sehen.

cc = Corpus callosum, Gef = Gefäß, Mol = Molekularschicht, Pur = Purkinjezellschicht, Kö = Körnerschicht. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm in A und B, 50 µm in E und 20 µm in C, D, F und G.

3.4. Expression der Arginase im Vorderhirn der Ratte

Wie bereits in den vorangegangenen Ergebnissen angeführt, wurde die Lokalisierung der Arginase entlang der rostrocaudalen Achse des Rattengehirns vom Bulbus olfactorius bis hin zum Cerebellum an Schnitten immunzytochemisch untersucht. Hierbei wurde eine breite Verteilung der Arginase in Neuronen und Neuropil beobachtet. In der Mehrzahl der Neurone stellt sich das Arginase-Immunsignal in einem granuliert/punktförmigen-intrazellulären Färbungsbild dar.

Es soll an dieser Stelle auf die Lokalisierung der Arginase in ausgewählten Arealen im Vorderhirn der Ratte näher eingegangen werden. Die Stärke der Arginase-Immunreaktivität variierte in den verschiedenen Neuronen und Bereichen des Neuropils.

3.4.1. Starkes Arginase-Immunsignal in Interneuronen und CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus

Die Arginase ist im Hippocampus weit verbreitet. Am stärksten wird sie in den mittleren zellreichen Schichten des Stratum pyramidale der CA1-Region des Cornu ammonis (Ammonshorn) und im Stratum granulare des Gyrus dentatus exprimiert. Verschiedene Neuropil-Regionen werden durch unterscheidbare Signalstärken abgegrenzt. In der CA1-Region enthalten die Pyramidenzellen und Interneurone ein starkes granuliert/punktförmiges, intrazelluläres Markierungsmuster. In der Vergrößerungsaufnahme zeichnen sich etwa mitochondriengroße Punkte ab (Abb. 13, B). Interneurone sind in CA3 ebenso stark markiert. Hingegen sind die Pyramidenzellen der CA2- und auch der CA3-Region weniger stark gefärbt (Abb. 13, C) als jene in CA1. Die granuliert/punktförmigen, intrazellulären Markierungsmuster sind in den Körnerzellen des Gyrus dentatus nur schwach erkennbar. Auch hier haben die Punkte in der Vergrößerungsaufnahme etwa Mitochondriengröße (Abb. 13, D).

Neben den hippocampalen Prinzipalneuronen enthalten auch zahlreiche hippocampale Interneurone eine deutliche Immunreaktivität. Zur Differenzierung von hippocampalen Interneuronen wurden Versuche mit Fluoreszenz-Doppelmarkierung durchgeführt. Positive Doppelmarkierungen zwischen Arginase und den Calcium-bindenden Proteinen Calbindin und Parvalbumin, die in Subpopulationen GABAerger Interneurone vorkommen, wurden nachgewiesen (Abb. 14). In Zellen, die das Calcium-bindende Protein

Calretinin enthalten, zeigte sich keine Überlappung des Immunsignals (nicht dargestellt).

3.4.2. Deutliche Expression der Arginase in Interneuronen des Cortex cerebri laminae II und III

Arginase wird in allen Schichten der Großhirnrinde exprimiert. Der anti-Arg1-Antikörper zeigt in der Mehrheit der Neurone ein starkes intrazelluläres Immunsignal und eine ebenso prominente Markierung des umgebenden Neuropils (Abb. 15, A). Das Neuropil unterscheidet sich in der Stärke der Markierung. In den Schichten II und III ist die Immunreaktivität des Neuropils kräftig. In den darunterliegenden Schichten IV-VI schwach (Abb. 15).

Markiert sind Interneurone und Pyramidenzellen, die stärkste Markierung wurde bei Interneuronen der Laminae II und III (Stratum granulosum externum und Stratum pyramidale externum) beobachtet (Abb. 15, B, C). Meist wurde die Arginase-Immunreaktivität als granuliert/punktförmig-intrazelluläres Muster beobachtet. Dies suggeriert eine Lokalisation in subzellulären Kompartimenten von ca. 0,5 µm Durchmesser (Abb. 15, Kasten in D).

Am Cortex wurden, ebenso wie am Hippocampus, Versuche mit Fluoreszenz-Doppelmarkierung durchgeführt. Auch hier wurden positive Doppelmarkierungen zwischen Arginase und dem Calcium-bindenden Interneuronenmarker Calbindin nachgewiesen (nicht dargestellt).

3.4.3. Basalganglien - Arginase markiert differenziertes Neuropil

Neurone und Neuropil der Basalganglien differieren stark in der Ausprägung ihrer Immunreaktivität (Abb. 16). Die anti-Arg1-Antikörper-Markierung wurde aber in allen Bereichen, mit ihrem typisch granuliert/punktförmigen, intrazellulären Muster, beobachtet. Die Neurone des Striatum sind am stärksten markiert, im Vergleich zu den etwas schwächer, aber dennoch deutlich erkennbaren Neuronen des medialen (internen) Globus pallidus (Abb. 16, E). Im Striatum wurde eine Immunfärbung in verschiedenen neuronalen Zelltypen festgestellt. Bis auf die Fasern (Abb. 16, D Sterne) zwischen Nucleus caudatus und Putamen ist das die Neurone umgebende Neuropil sehr stark markiert (Abb. 16; D). Dazu vergleichsweise schwach ausgeprägt ist die

Immunreaktivität der Neuropil-Regionen von lateralem (externem) Globus pallidus (Abb. 16; F) und Nucleus accumbens (nicht dargestellt), während die Neurone eine gleich starke Immunreaktivität zeigen.

3.4.4. Arginase-Verteilung in diencephalen Strukturen

Thalamus & Epithalamus

Im Thalamus haben die Arginase-Isoformen ein unterschiedliches Verteilungsmuster (Abb. 17). Die Arginase ist in der Stria medullaris kaum nachweisbar, während Neurone und Neuropil der medialen Habenula sehr stark vom anti-Arg1-Antikörper markiert sind (Abb. 17, C und E). Im Vergleich dazu ist das Immunsignal in der Region der lateralen Habenula eher mittelstark ausgeprägt (Abb. 17, D und F). Die Neurone des Nucleus paraventricularis thalami (posteriorer Teil) zeigen ebenfalls deutliche, granuliert/punktförmige, intrazelluläre Markierungsmuster (Abb. 17, G). Das umgebende Neuropil ist vergleichbar stark gefärbt.

Hypothalamus

Die Arginase ist in den meisten hypothalamischen Regionen auffindbar. Am stärksten ist das Immunsignal in den Neuronen des Nucleus supraopticus. Auch der Nucleus suprachiasmaticus weist eine starke Markierung des Antigens auf. Im Gegensatz dazu ist die Immunreaktivität im Chiasma opticum nur sehr schwach ausgeprägt. Die Neurone und ihr umgebendes Neuropil sind in der lateralen Region des Hypothalamus mittelstark gefärbt.

3.4.5. Sind die punktförmigen Muster in Mitochondrien lokalisiert?

In der Mehrheit der Neurone zeigt das Arginase-Immunsignal lichtmikroskopisch ein granuliert/punktförmiges, intrazelluläres Muster, je nach Hirnregion in unterschiedlich starker Intensität.

Elektronenmikroskopisch wurde die Arginase in präsynaptischen Endigungen in einem Teil kortikaler Synapsen nachgewiesen (Abb. 19, A). In neuronalen Zellkörpern wurde die Arginase regelmäßig im Golgi-Apparat beobachtet (Abb. 19, B). Selten wurden aber auch eröffnete Mitochondrien vom anti-Arg1-Antikörper markiert (Abb. 19, Kasten in B).

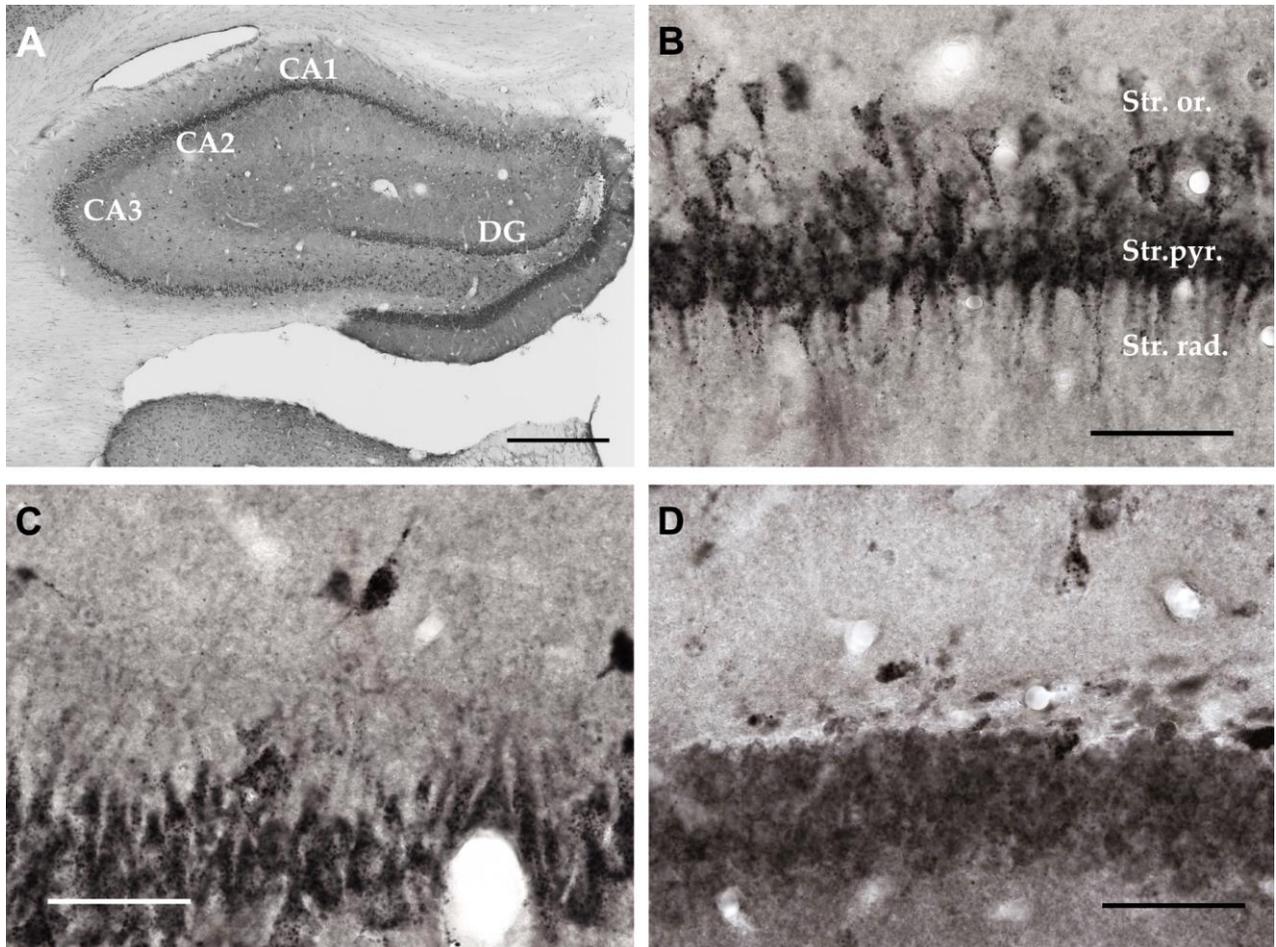


Abb. 13 : Immunzytochemische Darstellung der Arginase-Expression im Hippocampus der Ratte

A: Bei geringer Vergrößerung sind das Stratum pyramidale der CA1-Region und zahlreiche verstreute Zellen deutlich markiert. Ebenfalls konnten das Stratum granulare des Gyrus dentatus und verschiedene Neuropil-Gebiete unterschieden werden.

B: Bei höherer Vergrößerung zeigen Interneurone und Pyramidenzellen in der CA1- Region ein granuliert/punktförmiges-intrazelluläres Markierungsmuster.

C: In der CA3- Region sind die Pyramidenzellen weniger intensiv gefärbt als die der CA1- Region. Die Interneurone sind in CA3 stärker markiert.

D: In den Körnerzellen des Gyrus dentatus sind die granuliert/punktförmigen-intrazellulären Muster nur schwach erkennbar. Sie haben etwa Mitochondriengröße. CA1-3 = Cornu ammonis 1-3, DG = Gyrus dentatus, Str.or. = Stratum oriens, Str.pyr. = Stratum pyramidale, Str. rad. = Stratum radiatum. Die Maßstabsbalken entsprechen 400 µm in A und 50 µm in B, C und D.

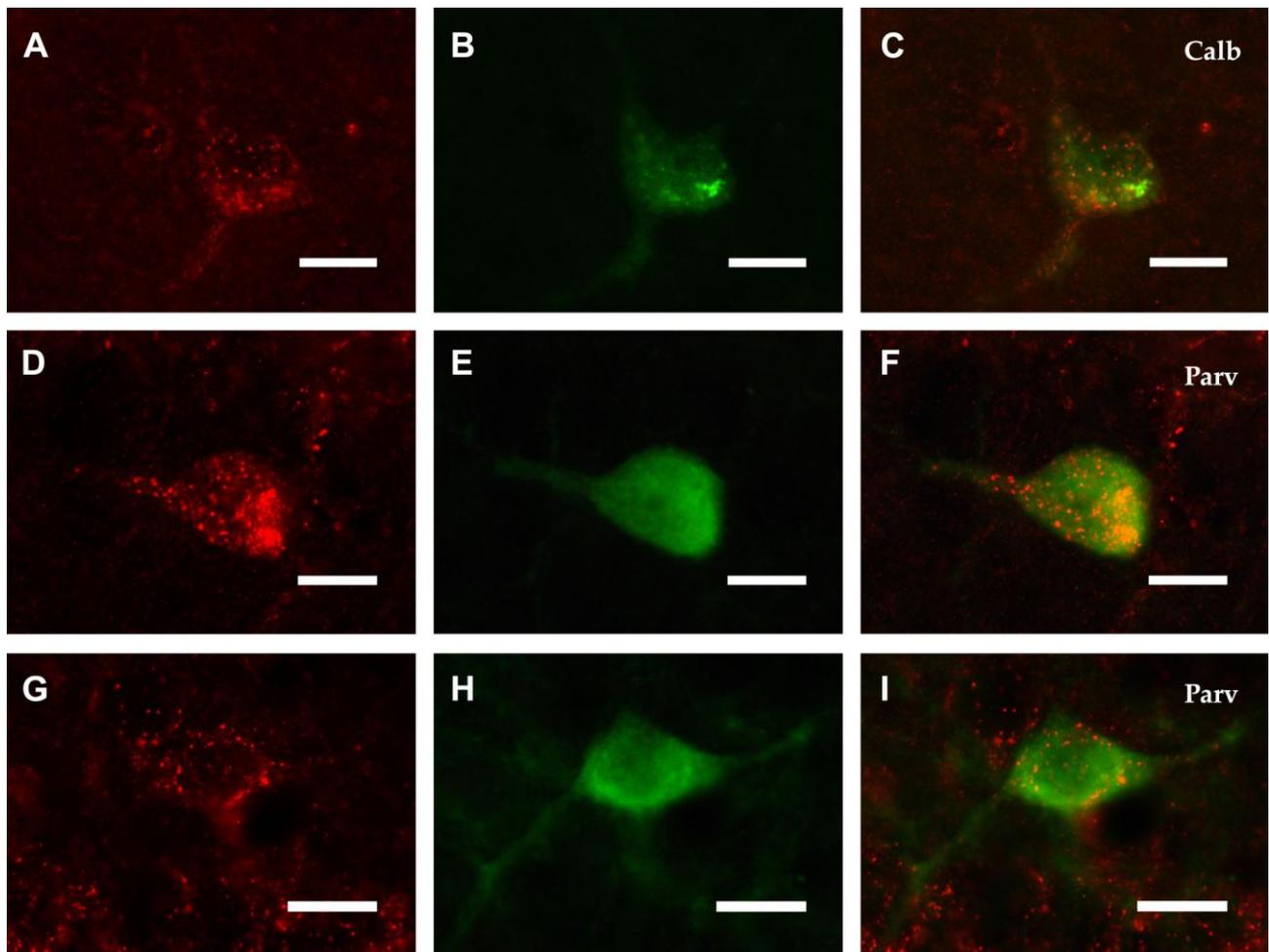


Abb. 14 : Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung

Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Arginase und die Calcium bindenden Proteine Calbindin (B und C) und Parvalbumin (E, F, H und I) in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus. Eine Kolokalisation der Arginase mit beiden Proteinen wurde beobachtet (C, F und I). Alle hippocampalen Interneurone die Arginase exprimieren, scheinen auch Calbindin und Parvalbumin zu beinhalten.

A-C: Doppelmarkierung von Antikörpern gegen Arginase und Calbindin in Interneuronen des Stratum radiale der hippocampalen CA3-Region.

D-F: Doppelmarkierung von Antikörpern gegen Arginase und Parvalbumin in Interneuronen des Stratum oriens der hippocampalen CA1-Region.

G-I: Doppelmarkierung von Antikörpern gegen Arginase und Parvalbumin in Interneuronen des Stratum pyramidale der hippocampalen CA1-Region.

Calb = Calbindin, Parv = Parvalbumin. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm in allen Bildern.

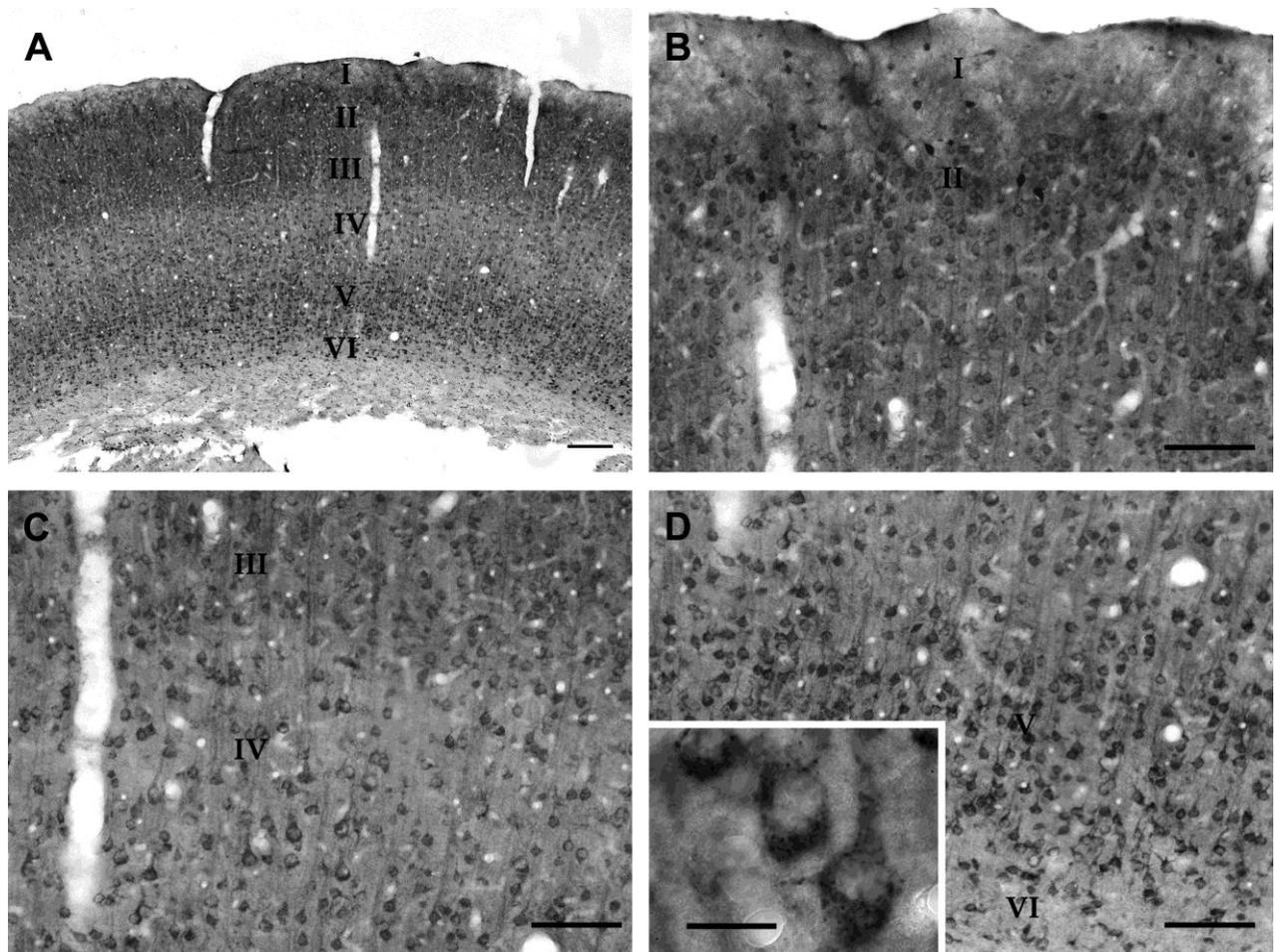


Abb. 15 : Immunzytochemische Markierung der Arginase im Cortex cerebri der Ratte

Übersichts- (A) und Detailaufnahmen (B, C, D) vom Cortex parietalis. Anti-Arginase-Immunreaktivität wurde in verschiedenen Neuronentypen beobachtet, am stärksten in Interneuronen der Laminae II und III. Meist wird die Arginase-Immunreaktivität als granuliert/punktförmig-intrazelluläres Muster beobachtet. Dies suggeriert eine Lokalisation in subzellulären Kompartimenten von ca. 0,5 µm Durchmesser (Kasten in D). Das Neuropil ist in den äußeren Laminae II-IV stärker markiert als in den tieferen Corteschichten. Es wird die Einteilung des Cortex parietalis in Laminae I-VI angenommen. Die Maßstabsbalken entsprechen 400 µm in A, 20 µm im Kasten in D und 100 µm in B, C und D.

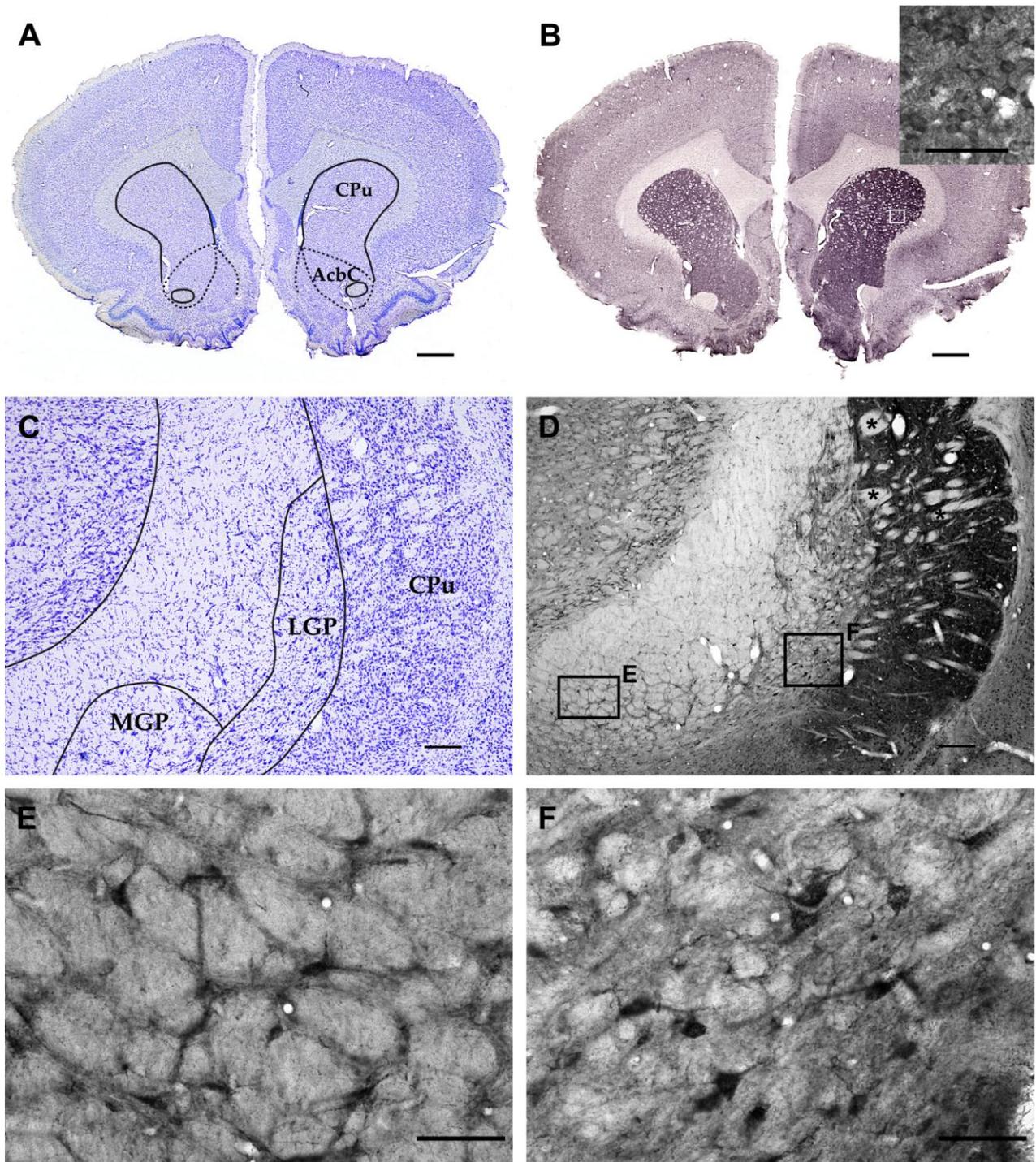


Abb. 16 : Arginase-Expression in den Basalganglien der Ratte

A: Schnitt mit Kresyl-Violett-Färbung aus der Region des Telencephalons ca. auf der Höhe Bregma 1,70 mm.

B: Der benachbarte Schnitt zu A wurde immunzytochemisch mit dem anti-Arg1-Antikörper markiert. Der Kasten zeigt eine Vergrößerung aus dem Caudate Putamen mit der typischen granuliert/punktförmigen-intrazellulären Antikörper Färbung.

C: Ausschnitt eines kresyl-violett gefärbten Schnittes aus der Region des Telencephalons ca. auf der Höhe Bregma -2,56 mm.

D: Der benachbarte Schnitt zu C wurde immunzytochemisch mit dem anti-Arg1-Antikörper markiert. Neurone und Neuropil des CPu zeigen im Vergleich zum medialen Globus pallidus und lateralen Globus pallidus die stärkste Immunreaktivität. Die Sterne deuten auf Fasern im CPu, die zwischen dem Putamen und dem Ncl. caudatus bestehen. E und F: Neurone und Neuropil des MGP (E) und LGP (F) sind etwa gleich stark markiert. Die Neurone weisen das typische granuliert/punktförmige-intrazelluläre Muster auf. CPu = Caudate-Putamen = Striatum, AcbC = Ncl. accumbens, MGP = medialer (interner) Globus pallidus, LGP = lateraler (externer) Globus pallidus. Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm in A und B, 400 μ m in C und D und 50 μ m im Kasten

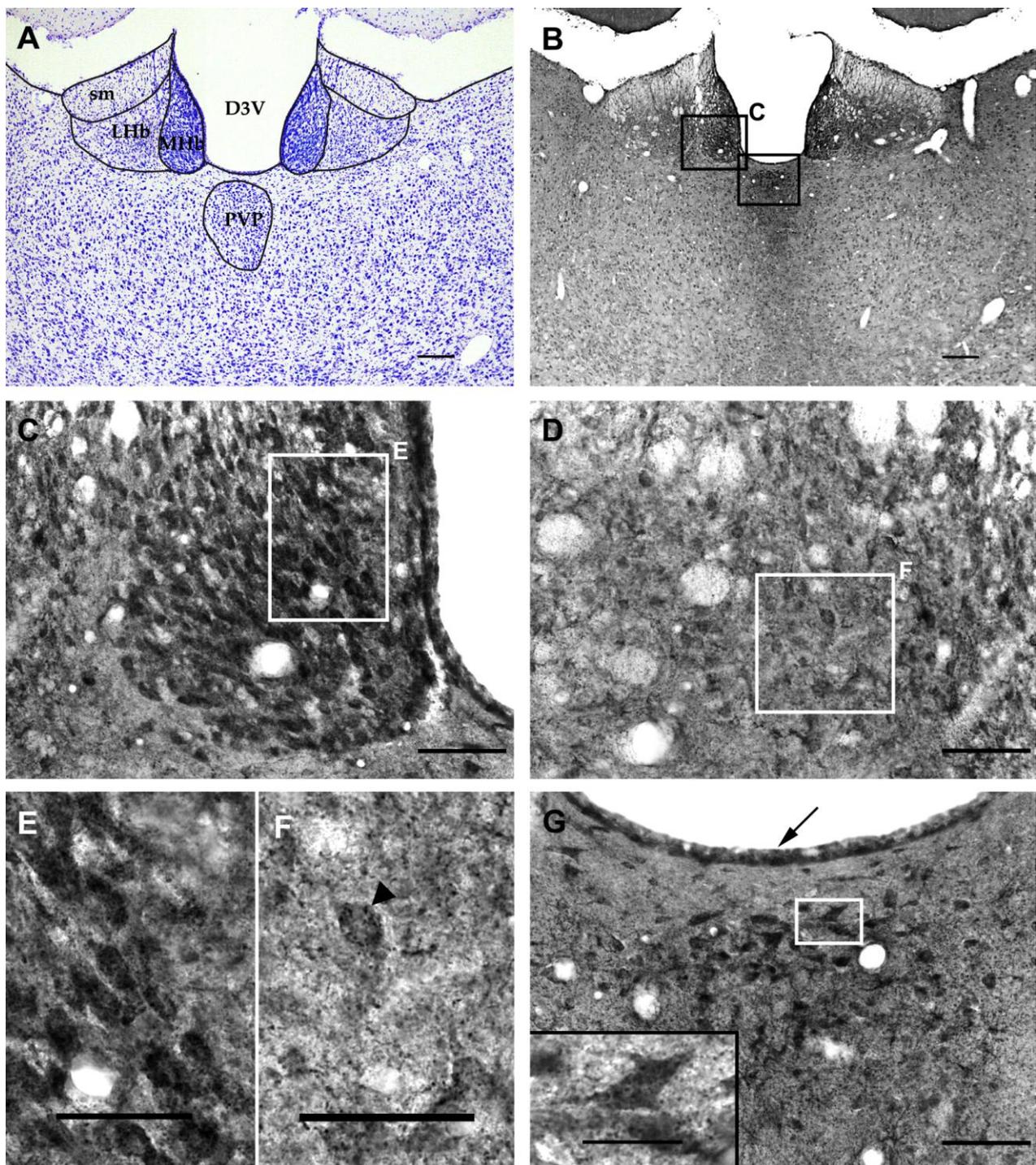


Abb. 17 : Arginase-Expression im Thalamus & Epithalamus der Ratte

A: Ausschnitt eines kresyl-violett gefärbten Schnittes aus der diencephalen Region ca. auf der Höhe Bregma -3,14 mm.

B: Immunzytochemisch markierter benachbarter Schnitt zu A. Das Immunsignal tritt besonders stark in den Regionen der medialen Habenula (C) und des Ncl. paraventricularis thalami (G) auf.

Neuropil und Neuronenfärbung zwischen MHb (C) und lateraler Habenula (D) differieren auffällig. Bereits bei geringer Vergrößerung ist ein intensiveres Immunsignal der MHb erkennbar. In den höher vergrößerten Arealen (E, F und Kasten in G) lassen sich die typischen intrazellulären Markierungsmuster erkennen. Der Pfeilkopf (F) deutet auf diese schwarzen punktförmigen Immunmarkierungen. Der Pfeil (G) weist auf ebenfalls gefärbtes Ependym.

sm = Stria medullaris, MHb = mediale Habenula, LHB = laterale Habenula, PVP = Ncl. paraventricularis thalami (posteriorer Teil), D3V = dorsaler dritter Ventrikel. Die Maßstabsbalken entsprechen 400 µm in A und B, 50 µm in C, D und G, 40 µm in E, F und 20 µm im Kasten (G).

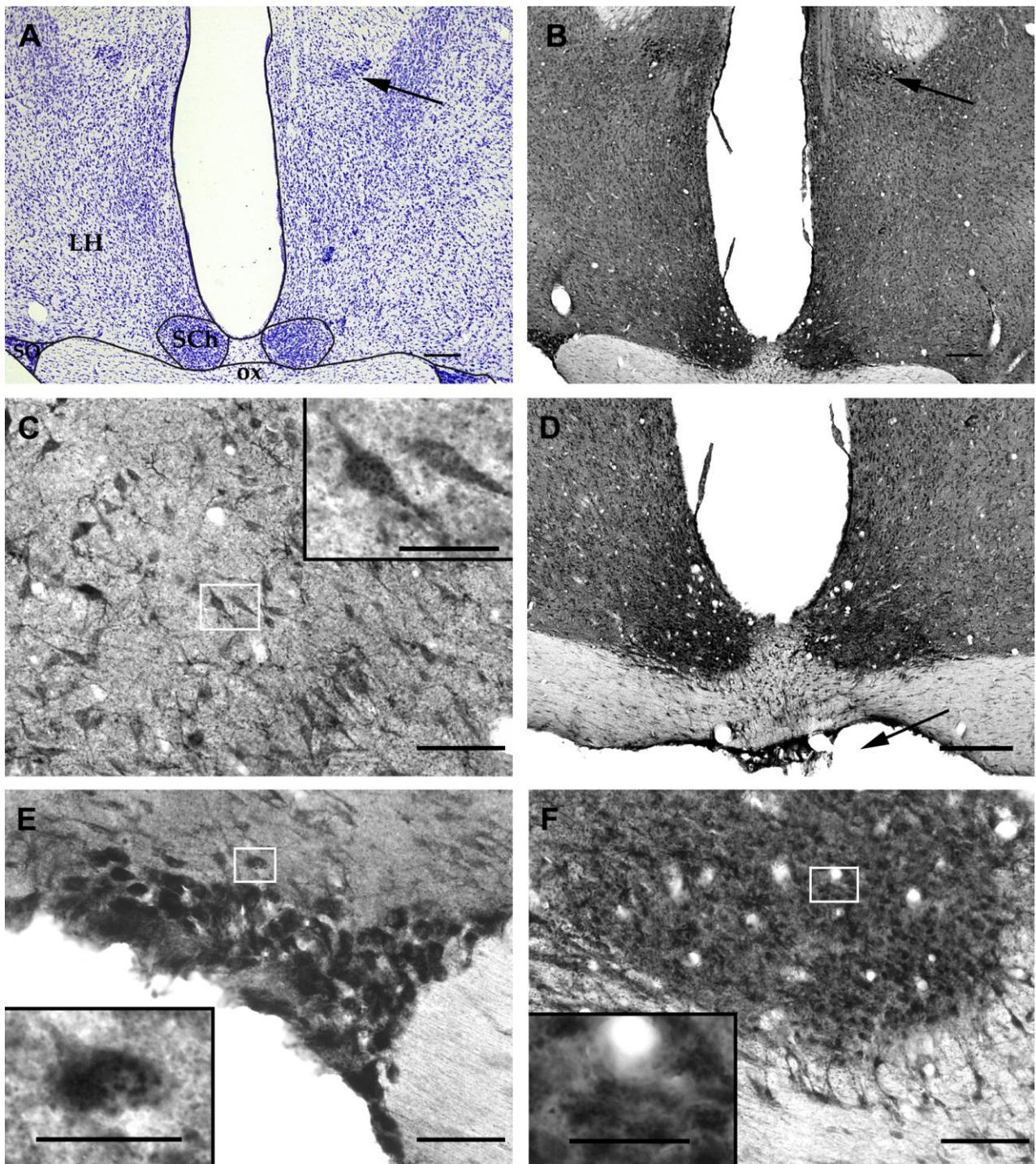


Abb. 18 : Immunzytochemische Markierung der Arginase-Expression im Hypothalamus der Ratte

A: Ausschnitt eines kresyl-violett gefärbten Schnittes aus der diencephalen Region ca. auf der Höhe Bregma - 1,40 mm. Die Pfeile in A und B zeigen auf den Ncl. paraventricularis hypothalami.

B: Der benachbarte Schnitt zu A wurde immunzytochemisch mit dem anti-Arg1-Antikörper markiert. Bereits bei geringer Vergrößerung sind die stark markierten Regionen des Ncl. supraopticus und des Ncl. suprachiasmaticus sichtbar. Bei hoher Vergrößerung kann man das typische intrazelluläre punktförmige Färbungsmuster des Antikörpers beobachten (Kästen in C, E und F). Der Pfeil in der Abbildung D zeigt auf die ebenfalls kräftig gefärbte Eminentia mediana.

SO = Ncl. supraopticus, SCh = Ncl. suprachiasmaticus, ox = Chiasma opticum, LH = laterale hypothalamische Region.

Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm in A und B, 50 µm in C, E und F, 200 µm in D und 20 µm in den Kästen.

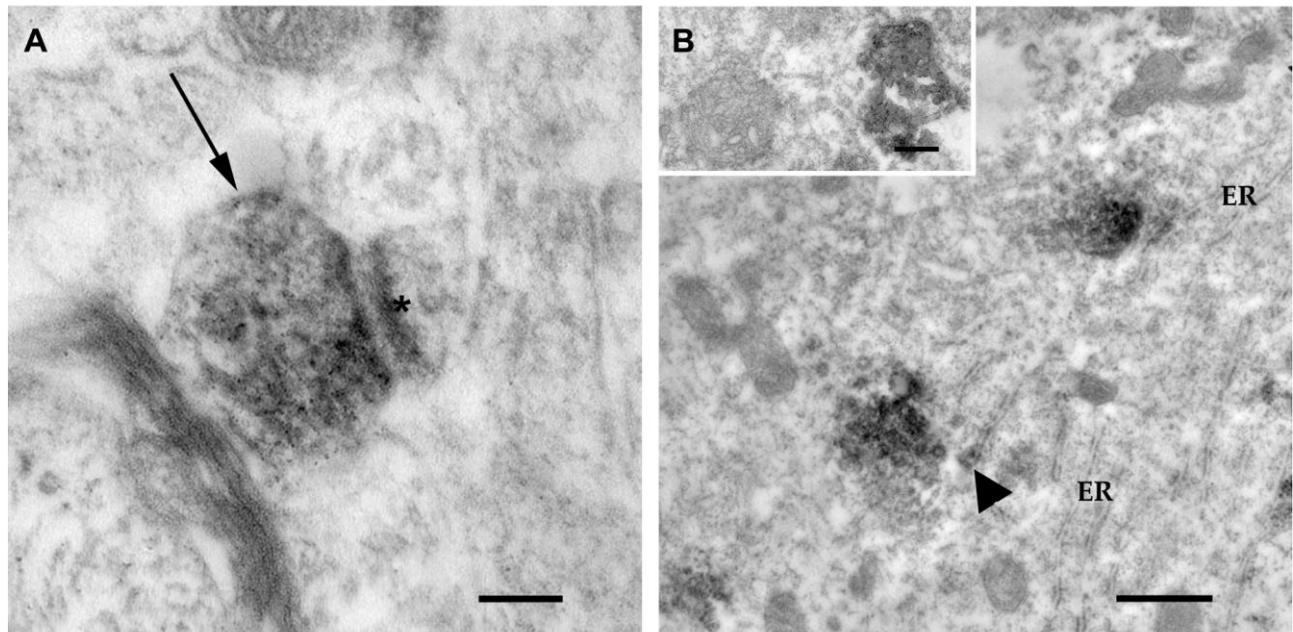


Abb. 19 : Elektronenmikroskopische Untersuchung von Hippocampusschnitten

Elektronenmikroskopischer Nachweis der Arginase in präsynaptischen Enden kortikaler Synapsen (A).

A: Deutlich erkennbar ist eine Präsynapse (Pfeil) mit dem dazugehörigen postsynaptischen Dorn (Sternchen).

B: In Neuronen wurde das Arginase-Signal deutlich im Golgi-Apparat beobachtet. Der Pfeilkopf zeigt hier auf einen prä-Golgi-Vesikel. Markierte zerstörte Mitochondrien wurden im Elektronenmikroskop ebenfalls beobachtet (Kasten in B).

ER = Endoplasmatisches Retikulum.

Die Maßstabsbalken entsprechen 100 nm in A, 500 nm in B und 200 nm im Kasten.

3.5. Gewinnung eines spezifischen anti-Arg1-Antikörpers und eines Antikörpers mit angereicherter Arginase 2-Immunreaktivität

Bei den immunzytochemisch gefärbten Rattengehirnschnitten kam es offensichtlich zu Markierungen beider Arginase-Isoformen durch den pan-Arginase-Antikörper. Beispielsweise wurde im Hippocampus ein unterschiedliches intrazelluläres Färbungsbild nachgewiesen. Interneurone zeigten unterschiedliche Immunreaktionen in den einzelnen Schichten (Abb. 20). Die Mehrheit der Neurone war granuliert gefärbt, während vereinzelte Interneurone eine homogene diffuse Färbung aufwiesen. Um herauszufinden, ob die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der Immunreaktion in diesen Interneuronen auf eine differentielle Expression der beiden Arg-Isoformen zurückzuführen ist, wurde eine Auftrennung des pan-Arginase-Antikörpers durchgeführt. Hierzu wurde der bereits affinitätsgereinigte anti-Arg1-Antikörper (pan-Arginase-Antikörper) mit dem an Nitrocellulose gebundenen C-Terminus des Arg2-Proteins vorinkubiert. Die durch diese Affinitätsreinigung erhaltenen Antikörper des Überstandes bzw. Eluates wurden anschließend im Vergleich mit dem anti-Arg1-Antikörper an hippocampalen Rattengehirnschnitten untersucht.

Mit den Überstand-Antikörpern wurden die vereinzelten hippocampalen Interneurone mit dem homogenen, diffusen intrazellulären Färbungsbild deutlich markiert (Abb. 20, C), während die Mehrheit der hippocampalen Neurone (Prinzipalzellen und Interneurone), die mit pan-Arginase-Antikörper ein granuliert/punktförmiges, intrazelluläres Färbungsbild (Abb. 20, B) aufwiesen, nur sehr schwach gefärbt wurden. Man kann zusammenfassend sagen, dass die Überstand-Antikörper vorwiegend Arg1 markieren und eine homogene diffuse intrazelluläre Färbung verursachen. Diese wurde bei hippocampalen Interneuronen im Stratum pyramidale beobachtet (Abb. 20, C). Die Eluat-Antikörper hingegen markieren bevorzugt Arg2 und verursachen das, bei den hippocampalen Prinzipalzellen im Stratum pyramidale und Interneuronen des Stratum radiatum häufig zu beobachtende, granuliert/punktförmige-intrazelluläre Färbungsbild (Abb. 20, D).

ELISA zur Testung der Kreuzreaktivität

Der ELISA dient der Überprüfung der Spezifität der gereinigten Antikörper anti-Arg1-Antikörper (pan-Arginase-Antikörper), Überstand-Antikörper und Eluat-Antikörper gegenüber dem Antigen Arginase.

Erwartet wurde, dass der pan-Arginase-Antikörper und der Überstand-Antikörper eine im Vergleich zu 6HisTR-Arg2 höhere Reaktivität gegen 6HisTR-Arg1 aufweisen, während die Werte des Eluat-Antikörpers eine relativ höhere Reaktivität gegen 6HisTR-Arg2 im Vergleich zu 6HisTR-Arg1 und zeigen sollten.

Dieser Erwartung entsprachen die tatsächlich gemessenen Ergebnisse, die die höchste gemessene Extinktion des pan-Arginase-Antikörpers und Überstand-Antikörpers für 6HisTR-Arg1 auswiesen. Im Vergleich dazu liegen die Extinktionsmesswerte für die beiden 6HisTR-Arg2-Fusionsproteine auf entsprechend niedrigem Niveau. Die mit Sternen gekennzeichneten Extinktionsmesswerte aus der Abbildung einer 1:3000-Verdünnung mussten, da sie oberhalb des linearen Bereiches des ELISA-Testsystems lagen, mathematisch korrigiert werden. Sie wurden mit den Extinktionsmesswerten einer 1:10000-Verdünnung extrapoliert. Insgesamt ergeben sich die höchsten Extinktionsmesswerte für beide Fusionsproteine, wie zu erwarten, bei dem pan-Arginase-Antikörper. Die Extinktionsmesswerte der beiden Antikörperfraktionen ergeben additiv einen vergleichbaren Wert wie für den pan-Arginase-Ausgangantikörper bestimmt wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der anti-Arg1-Antikörper zwischen Arg1 und Arginase 2 (Arg2) nicht unterscheiden kann und primär gemeinsame Epitope erkennt, die in beiden Arginase-Isoformen vorkommen sowie Arg1 spezifische Epitope (Abb. 5). Damit fungiert der, gegen Arg1 entwickelte, anti-Arg1-Antikörper als pan-Arginase-Antikörper. Unter Verwendung einer Arg2 spezifischen Sequenz wurde dieser pan-Arginase-Antikörper weiter in einen Eluat-Antikörper (bindet bevorzugt an Arg2, aber auch an Arg1) und Überstand-Antikörper (bindet spezifisch an Arg1 und nicht an Arg2) aufgeteilt.

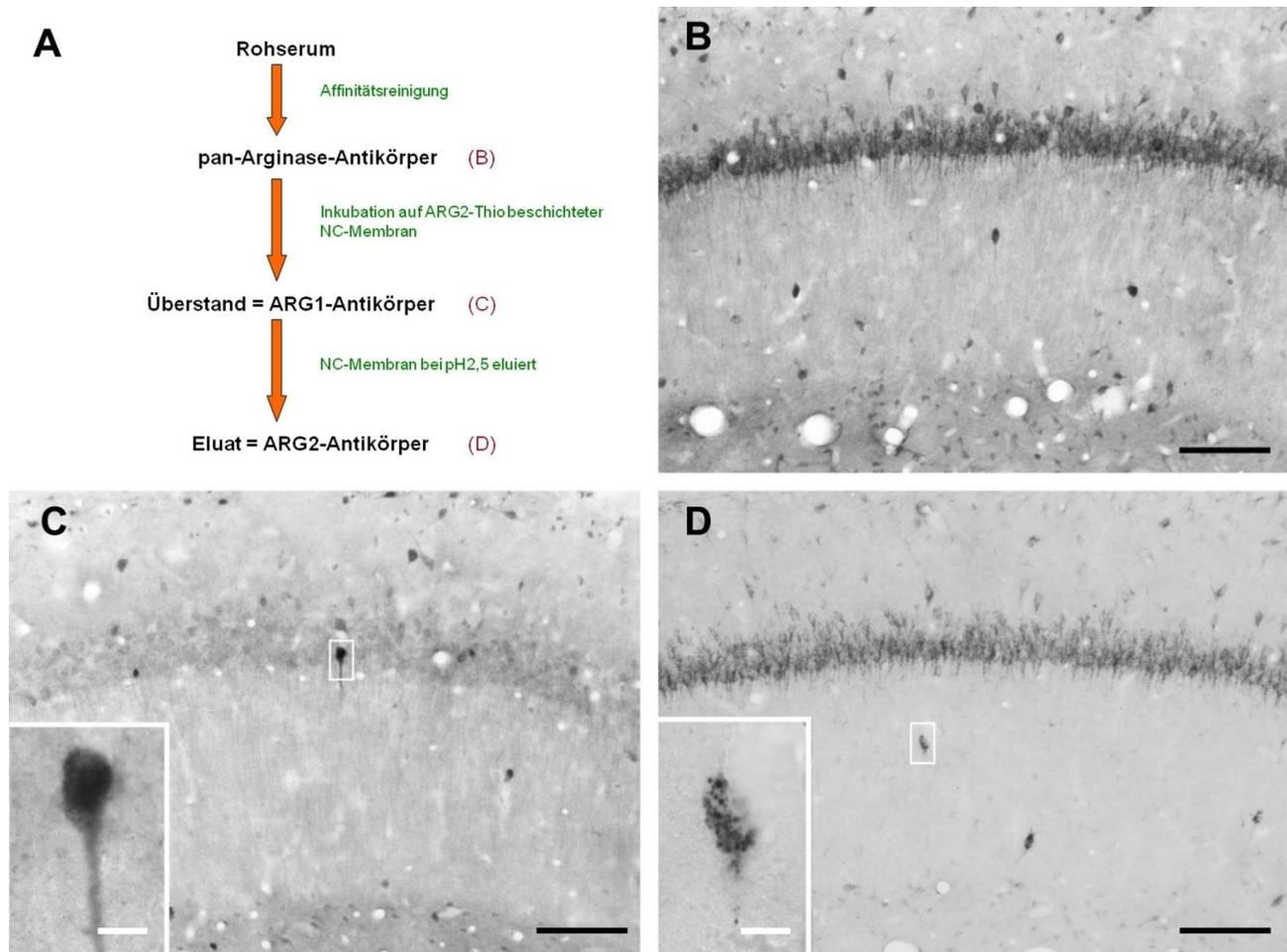


Abb. 20 : Aufreinigung des pan-Arginase-Serum von Arginase 1 und Arginase 2 reaktiven Anteilen

Da die Arg1- und Arg2-Proteinsequenzen eng miteinander verwandt sind, erkennt der gegen Arg1 hergestellte, affinitätsgereinigte Antikörper wahrscheinlich auch Arg2. Durch Vorinkubation dieses Antikörpers mit Arg2-spezifischem rekombinantem Protein (A), wurde der anti-Arg1-Antikörper (pan-Arginase-Antikörper) (B) in zwei Teile, Überstand und Eluat, aufgetrennt. Überstand- (C) und Eluat-Antikörper (D) wurden an hippocampalen Rattengehirnschnitten untersucht. Der Überstand-Antikörper markiert spezifisch Arg1 und zeigt eine homogene, diffuse, intrazelluläre Färbung. Diese wurde bei hippocampalen Interneuronen im Stratum pyramidale beobachtet (Abb. 20, C). Der Eluat-Antikörper hingegen markiert bevorzugt das Arg2-Antigen und verursacht das, bei den hippocampalen Prinzipalzellen im Stratum pyramidale und vereinzelten Interneuronen des Stratum radiatum häufig zu beobachtende, granuliert/punktförmige-intrazelluläre Färbungsbild (Abb. 20, D). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm in B; C und D sowie 10 μm in den Kästen der Abbildungen C und D.

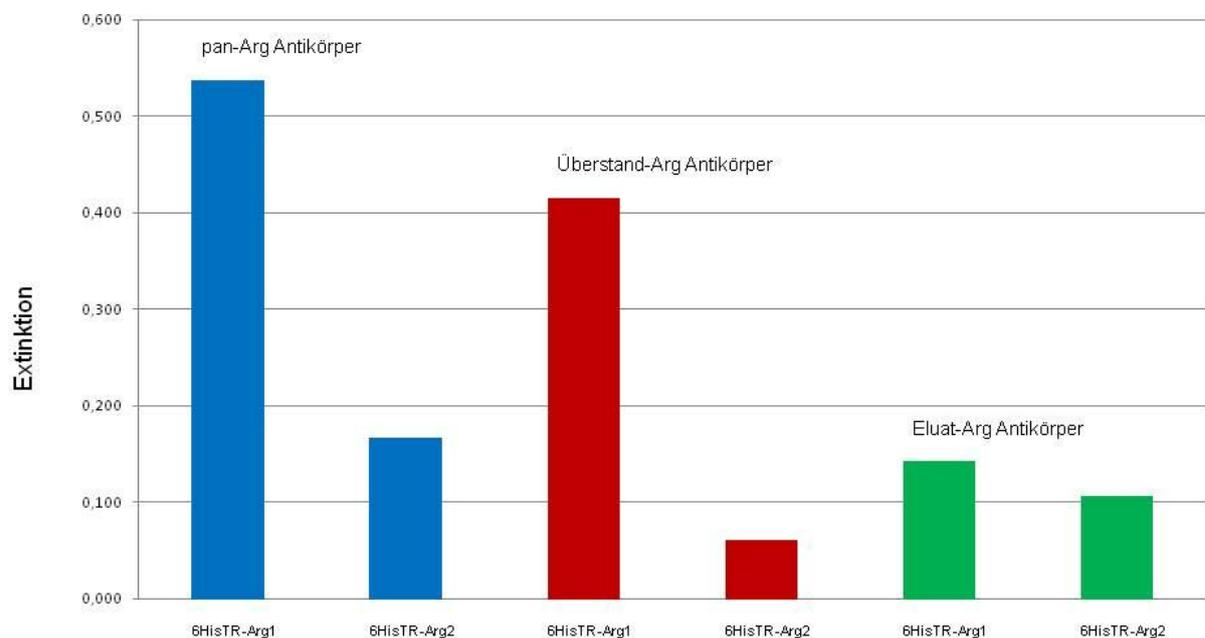
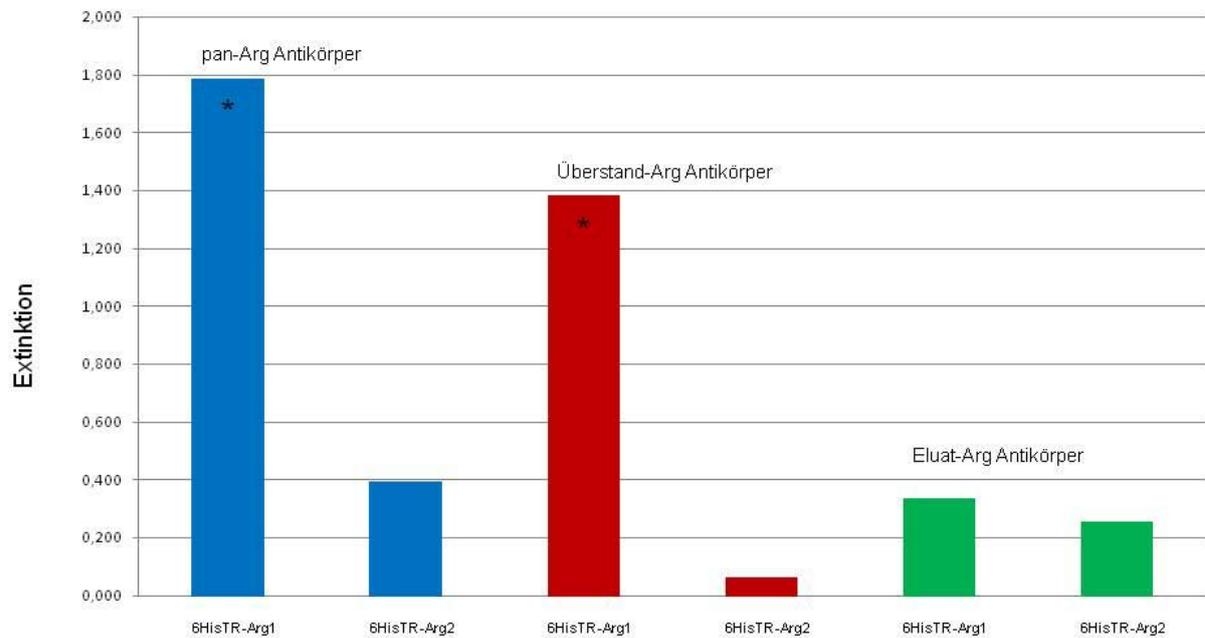


Abb. 21 : ELISA zur Testung der Kreuzreaktivität. Antikörper 1:3000 (oben) und 1:10000 (unten)

Die ELISA-Platte wurde mit den Fusionsproteinen 6HisTR-Arg1 und 6HisTR-Arg2 beschichtet. Blaue Balken demonstrieren die Immunreaktivität des anti-Arg1-Antikörpers (pan-Arginase-Antikörper), die roten Balken die der Überstand-Antikörper (Arg1-Fraktion) und die grünen Balken zeigen die Immunreaktivität der Eluat-Antikörper (>Arg2-Fraktion). Während anti-Arg1-Antikörper und Überstand-Antikörper eine starke Immunreaktivität gegen 6HisTR-Arg1 zeigen, führten die Eluat-Antikörper bei beiden Arginasefusionsproteinen zu ähnlichen Messwerten. Die mit * versehenen Messwertbalken wurden mathematisch an die anderen Messwerte angeglichen.

4. Diskussion

4.1. Herstellung eines Arginase 1/ pan-Arginase-Antikörpers

In einer Studie zu den Arginase-Isoformen der Maus (Yu et al., 2001) wurde mit Hilfe von Northern Blot-Analysen Arg1 deutlich in der Leber und sehr schwach im Gehirn detektiert, während Arg2 in der Niere aber nicht im Gehirn beobachtet wurde. Mit *in situ* Hybridisierungs-Experimenten wurde dagegen eine breite Verteilung der Arg im Gehirn der Ratte (Braissant et al., 1999) und der Maus (Yu et al., 2001) festgestellt. Arg1 wurde stärker exprimiert als Arg2. Die Daten aus der *in situ* Hybridisierung am Rattengehirn (Braissant et al., 1999) zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der Arg2-Expression mit unseren immunzytochemischen Ergebnissen an der Ratte. Allerdings können Ergebnisse aus *in situ* Hybridisierung nur zeigen, welche Neurone die entsprechende mRNA exprimieren. Unsere immunzytochemischen Experimente geben darüber hinaus noch Aufschluss über die subzelluläre Lokalisierung der Arginase in den verschiedenen Neuronen. Für die zuvor an der Maus erhaltenen immunzytochemischen Experimente (Yu et al., 2001) wurde ein kommerzieller Antikörper verwendet, der allerdings nach den Informationen des Herstellers nicht ausreichend für immunzytochemische Anwendungen charakterisiert wurde. Aus diesem Grund wurde für die vorliegenden Untersuchungen ein selbst hergestellter, gut charakterisierter Antikörper verwendet. Die Sequenzvergleiche der ausgewählten Immunisierungssequenz mit potentiell kreuzreagierenden Proteinen ergaben eine zu erwartende Kreuzreaktivität des Arg1-Antikörpers mit der zweiten Isoform, Arg2 (Morris et al., 1997; Mori, 2007), die durch die Experimente bestätigt wurde. Das nächstverwandte Protein, Agmatinase (23% Sequenzübereinstimmung), zeigte hingegen keine Kreuzreaktivität, was die Spezifität des hier verwendeten Antikörpers belegt. Im ELISA (Abb. 6) zeigten beide Arginase-Konstrukte starke Immunreaktivität, während beide Agmatinaseproteine zu ähnlich niedrigen Messwerten wie das Trägerprotein Thioredoxin führten. Gegen reines GST-Protein bestand noch eine Restaktivität. Diese Restaktivität wurde auch in der Negativkontrolle im Western Blot (Abb. 8) deutlich. Die dort bestehende Bande wurde durch Antikörper gegen den bakteriellen GST-Fusionsanteil hervorgerufen, die nach der Affinitätsreinigung noch in dem aufgereinigten Serum enthalten sind. Da es sich hierbei aber um ein bakterielles Protein handelt und zudem anti-GST-Antikörper keine Färbung im Rattengehirn hervorgerufen, war dies für die immunzytochemischen Versuche nicht von Bedeutung. Die zu

erwartende Kreuzreaktivität des anti-Arg1-Antikörpers mit beiden Arg-Isoformen bestätigten die immunzytochemischen Versuche an nicht-neuronalen Geweben. In den periportalen Hepatozyten der Leber (Yu et al., 2003; Choi et al., 2012), wird besonders Arg1 stark exprimiert. Arg2 findet sich dagegen besonders in den proximalen Nierentubuli und den Markstrahlen der Niere (Miyataka et al., 1998; Ozaki et al., 1999; Yu et al., 2003; Choi et al., 2012). Über das Vorkommen der Arg1 in der Niere und der Arg2 in der Leber gab es aufgrund der Unterschiede in Spezifität und Sensitivität der verschiedenen verwendeten Nachweismethoden (Western Blot, Immunocytochemie, RT-PCR) unterschiedliche Ergebnisse (Spector et al., 1994; Miyataka et al., 1998; Yu et al., 2003; Morris 2009; Choi et al., 2012). Die in dieser Arbeit mit dem anti-Arg1-Antikörper markierten Schnitte von Rattenniere und -leber zeigten jeweils ein deutliches Immunsignal (Abb. 10). Aus diesem Ergebnis lässt sich daher auf die pan-Arginase-Aktivität des verwendeten Antikörpers schließen. Es ist hierbei jedoch nicht auszuschließen, dass in beiden Organen jeweils beide Isoformen vorkommen können.

Auch bei den immunzytochemisch gefärbten Rattengehirnschnitten kam es offensichtlich zu Markierungen beider Arginase-Isoformen durch den pan-Arginase-Antikörper. Beispielsweise wurde im Hippocampus ein unterschiedliches intrazelluläres Färbungsbild nachgewiesen. Interneurone zeigten unterschiedliche Immunreaktionen in den einzelnen Schichten (Abb. 20). Die Mehrheit der Neurone war dabei granuliert gefärbt und vereinzelte Interneurone hatten eine homogene diffuse Färbung. Beide Arginase-Isoenzyme wurden zuvor im Mausgehirn (Yu et al., 2001; Deignan et al., 2007) und im Rattengehirn (Braissant et al., 1999; Choi et al., 2012) gefunden. Allerdings gibt es unterschiedliche Studienergebnisse hinsichtlich des Vorhandenseins und der Intensität des Immunsignals der Isoenzyme (Vockley et al., 1996; Gotoh et al., 1997; Morris et al., 1997; Braissant et al., 1999; Yu et al., 2001; Levillain et al., 2005). Dabei ist unklar, ob diese Diskrepanzen methodischer Natur sind oder aber Speziesunterschiede widerspiegeln.

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen intrazellulären Immunreaktionen der Interneurone durch Kreuzreaktivitäten des Antikörpers hervorgerufen wurden, wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt mit einem Arg2-Proteinfragment durchgeführt. Aus diesen Experimenten lässt sich zusammenfassend folgern, dass die Überstand-Antikörper vorwiegend Arg1 markieren und eine homogene diffuse, intrazelluläre Färbung verursachen. Diese wurde bei hippocampalen Interneuronen im Stratum pyramidale beobachtet (Abb. 20, C). Die Eluat-Antikörper hingegen markieren bevorzugt Arg2 und verursachen

bei hippocampalen Prinzipalzellen im Stratum pyramidale und vereinzelt Interneuronen des Stratum radiatum ein häufig zu beobachtendes, granuliert/punktförmiges, intrazelluläres Färbungsbild (Abb. 20, D). Demnach ist deutlich, dass der anti-Arg1-Antikörper, als pan-Arginase-Antikörper fungierend, beide Arginase-Isoenzyme im Hippocampus der Ratte markiert. Er erkennt primär gemeinsame Epitope, die in beiden Arginase-Isoformen vorkommen, sowie Epitope, die Arg1-spezifisch sind. Arg2 spezifische Epitope können vom anti-Arg1-Antikörper demnach aber nicht erkannt werden.

4.2. Spezifität des Antikörpers

Seit ihrer Einführung 1958 durch Coons wurde die Immunzytochemie zu einer sehr häufig angewandten Methode zur hochaufgelösten Lokalisation von Antigenen, vorwiegend Proteinen, auf zellulärer und subzellulärer Ebene (Saper, 2009). Viele immunzytochemische Studien wurden mit kommerziellen Antikörpern durchgeführt, wobei häufig keine ausreichende Charakterisierung des jeweiligen Antikörpers erfolgte und somit Unklarheiten hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität bestehen (Saper, 2009). Hinsichtlich dieser Problematik wird daher empfohlen, ein bestimmtes Procedere zur Charakterisierung von Antikörpern einzuhalten (Pradidarcheep et al., 2008; Saper, 2009), das bei der Herstellung der hier verwendeten Antikörper berücksichtigt wurde. Der gereinigte anti-Arg1-Antikörper wurde hinsichtlich seiner Sensitivität und Spezifität in verschiedenen Experimenten getestet. ELISA und Western-Blot-Analysen mit rekombinanten Fusionsproteinen zeigten, dass der anti-Arg1-Antikörper die entsprechende Arg1-Sequenz in den rekombinanten Thioredoxin- und GST-Fusionsproteinen spezifisch erkennt. Als weiteres Kriterium für die Spezifität des Antiserums sollte nachgewiesen werden, dass der Antikörper sein Epitop bindet (Saper, 2009). Der Nachweis wurde durch Western-Blot-Analysen gesichert, welche zeigten, dass der anti-Arg1-Antikörper sein Epitop mit dem in der Literatur (Yu et al., 2001; Cederbaum et al., 2004) angegebenen Molekulargewicht spezifisch erkennt und keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen aufweist. Um zu zeigen, dass der Antikörper nur ein Epitop auch in fixiertem Gewebe markiert, wurde die DNA des Epitops in Zellen transfiziert, die das Protein in der Gewebekultur normalerweise nicht exprimieren. Nach der anschließenden Fixation und Färbung zeigten nur die transfizierten Zellen, im Gegensatz zur nicht transfizierten Kontrollpopulation, eine positive Farbreaktion (Saper, 2009).

In Western-Blot-Experimenten und immunzytochemischen Färbungen an transfizierten HeLa-Zellen (transfiziert mit Ratten-Arg1 kodierender full length cDNA) wiesen nur die transfizierten Zellen ein spezifisches Arg-Immunsignal auf. Dieses Experiment beweist, dass der Antikörper das Protein in voller Länge in einer zellulären Umgebung erkennt. Somit eignet sich der Antikörper für Immunzytochemie auf Gehirnschnitten.

Eine weitere Kontrolle für die spezifische Färbung im Gewebe ist die Blockadekontrolle. Bei diesem Versuch wird der Antikörper in bestimmter Verdünnung mit dem Antigen vorinkubiert. Das Färbungssignal im Gewebe sollte bei der anschließenden Immunzytochemie komplett blockiert sein (Saper, 2009). Beispielsweise konnte in Western-Blot-Analysen und an immunzytochemisch gefärbten Schnitten des Rattengehirns die spezifische Immunreaktion durch eine Vorinkubation des anti-Arg1-Antikörpers mit Arg1-Thioredoxin komplett blockiert werden. Hierbei ist anzumerken, dass die Aktivität gegen das GST-Arg1-Fusionsprotein im Western Blot nur partiell blockiert wurde. Wie oben bereits erwähnt, wurde diese Restaktivität durch Antikörper gegen den bakteriellen GST-Fusionsanteil hervorgerufen, der nach wie vor in den aufgereinigten Antikörpern enthalten ist.

Der anti-Arg1-Antikörper detektiert sein Antigen sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen, was mit der Mehrheit der Veröffentlichungen übereinstimmt (Swamy et al., 1983; Braissant et al., 1999; Choi et al., 2012; Ahn et al., 2012). Demgegenüber haben Yu et al. (2001) das Arg1-Protein und die Arg2-mRNA ausschließlich in Neuronen und nicht in Gliazellen gefunden. Dieser Widerspruch könnte methodische Gründe haben oder durch die Verwendung verschiedener Versuchstierspezies, hier Maus bzw. Ratte, bedingt sein.

Bonaparte et al. (2006) beschreiben erstmals eine inverse Beziehung zwischen Arg1-Aktivität, welche in Gliazellen des ZNS durch Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1) reguliert wird, und Stickstoffmonoxid (NO). Dies ist für die Modulation des angeborenen Immunsystems relevant. In Mikrogliazellen, den Makrophagen des Gehirns, wurde die Arginaseaktivität bei mitochondrialer Dysfunktion untersucht: mitochondriale Toxine inhibieren die IL-4-induzierte Arginase-Aktivität und -Expression. Hier ist Arginase Teil des alternativen Immunaktivierungsweges, welcher an Wundheilung und Entzündungsabschwächung, verbunden mit Abwehrfunktionen, beteiligt ist (Munder et al., 1999; Ferger et al., 2010). Weitere Studien (Wiesinger, 2001; Lee et al., 2003) untersuchten die Regulierung von iNOS-Translation und NO-Produktion durch die Arg1 in einer Vielzahl von Zellen u.a. auch Astrozyten. Da die

neuronalen Isoform der NO-Synthase (nNOS) massiv in einer Subpopulation von Interneuronen exprimiert wird, ist eine Überschneidung der beiden Stoffwechselwege in bestimmten Interneuronen wahrscheinlich. Dies wurde jedoch bisher noch nicht untersucht.

Die beste Kontrolle für die Spezifität einer immunzytochemischen Färbung ist die Verwendung von Knockout-Tieren. Die Zucht der von verschiedenen Autoren (Cederbaum et al., 2004; Deignan et al., 2007; Iyer et al., 2002) hergestellten und publizierten Arg1-Knockout- und Arg2-Knockout Mäuse wurde leider zwischenzeitlich eingestellt, so dass hier keine entsprechenden Kontrollexperimente durchgeführt werden konnten.

Funktionell hatten Arg1-Knockout Mäuse nahezu keine Arginase-Aktivität in der Leber (Iyer et al., 2002). Sie starben am 10.-14. Tag postnatal und wiesen dabei Symptome eines stark erhöhten Ammoniakgehaltes im Blut auf, einschließlich Enthirnungsstarre, Lethargie und eines hochfrequenten Extremitätentremors. Im Gegensatz dazu erschien der Phänotyp von Arg2-Knockout Mäusen (Shi et al., 2001) unauffällig und zeigte, außer einer verminderten Fruchtbarkeit der männlichen Knockout-Mäuse, scheinbar keine weiteren Symptome. Versuche mit Arginase single- und double-Knockout-Mäusen (Deignan et al., 2007) lassen vermuten, dass weder Arg1 noch die Arg2 für die Bereitstellung von Ornithin für den Polyamin-Stoffwechsel notwendig sind.

4.3. Breite Verteilung der Arginase im Rattengehirn

Die Arg1, ein zytosolisches Enzym, wird als Teil des Harnstoffzyklus hauptsächlich in der Leber und nur in einem limitierten Umfang in einigen anderen Geweben z.B. Pankreas, Thymus, Speicheldrüsen exprimiert (Morris et al., 1997; Yu et al., 2003). Die vorrangige Aufgabe von Arg1 scheint in der Entgiftung von Ammoniumionen in Form von Harnstoff zu liegen. Im Gegensatz dazu wird die Arg2, ein mitochondriales Enzym, moderat in Niere, Gehirn, Dünndarm, Milchdrüsen und Makrophagen exprimiert, aber nur schwach in der Leber (Grody et al., 1987; Morris et al., 1997; Munder et al., 1999; Mori, 2007). Braissant et al. (1999) fanden Arg2-mRNA lokalisiert bzw. konzentriert in der perinukleären Region von Neuronen und Gliazellen im Rattengehirn. Arg2 dient hier hauptsächlich der Produktion von Ornithin als Vorläufer von Prolin und Polyaminen und ist in Apoptoseprozesse involviert (Morris et al., 1997).

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit den immunzytochemischen Daten aus der Maus von Yu et al. (2001) und den Daten aus in situ Hybridisierung von der Ratte

(Braissant et al., 1999) verglichen. Diese zeigten mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung bzw. Immunzytochemie, dass die Arginase-Isoenzyme im Gehirn weit verbreitet sind.

In Tabelle 3 sind alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zu diesen Veröffentlichungen mit den jeweiligen Signalintensitäten dargestellt. Die Stärke der Immunreaktivität wurde in fünf Kategorien eingeordnet. Sie reicht dabei von „- : kein Immunsignal vorhanden“, wie im Colliculus superior, bis zu „sehr stark“ (+++++), wie in der CA1-Region des Hippocampus.

Vereinzelte Abweichungen könnten methodische Gründe haben oder Ergebnis von Speziesunterschieden sein. Mit dem hier verwendeten Antikörper wurde die Lokalisierung des Arginase-Proteins im Cortex cerebri, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Mesencephalon, Metencephalon und in den Basalganglien auf regionaler, zellulärer und subzellulärer Ebene charakterisiert. Die bisher wenigen Daten aus *in situ* Hybridisierung sowie Immunzytochemie (Braissant et al., 1999; Choi et al., 2012) wurden damit erweitert. Arginase wird konstitutiv und weit verbreitet in Neuronen im Gehirn der Ratte exprimiert. Das Enzym scheint somit für den Stoffwechsel im Gehirn von grundlegender Bedeutung zu sein. Zudem werden Arg1 und Arg2 laut Literatur in den gleichen Zelltypen exprimiert, vermutlich aber nicht in den gleichen Zellkompartimenten (Yu et al., 2001; Cederbaum et al., 2004). Diese Frage könnte mit Hilfe der hier beschriebenen Fraktionen des pan-Arginase-Antikörpers zukünftig auf subzellulärer Ebene beantwortet werden.

4.3.1. Arginase-Expression in Interneuronen und CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus

Die Polyamine Spermidin und Spermin sind im Gehirn weit verbreitet. Jedoch sind beide in den verschiedenen Neuronen und Gliazellen unterschiedlich verteilt (Fujiwara et al., 1997; Laube et al., 2002; Laube et al., 1997). Ähnlich verhält es sich mit ODC, dem Enzym für die Putrescinsynthese (Bernstein und Müller, 1999; Junttila et al., 1993; Kilpeläinen et al., 2000). Eine wesentliche Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist die ebenfalls unterschiedliche regionale Expression der Arginase im Gehirn der Ratte. Während Arginase konstitutiv und weit verbreitet in den Neuronen im Gehirn der Ratte exprimiert wird, weist die verstärkte Arginase-Expression in mehreren zentralen Hirnregionen, wie beispielsweise dem Striatum, dem Hippocampus und in Klein- und Großhirnrinde darauf hin, dass hier ein gesteigerter Bedarf besteht.

Tabelle 3: Verteilung der Arginase im Rattengehirn

Vergleich der immunzytochemisch mit dem anti-Arg1-Antikörper gewonnenen Ergebnisse mit den Daten von Braissant et al, 1999 und Yu et al, 2001.

Die Stärke der Immunreaktivität wurde wie folgt dargestellt; - : Immunsignal nicht vorhanden; (+): kaum feststellbares Immunsignal; + : schwaches Immunsignal; ++ : moderates Immunsignal; +++ : starkes Immunsignal; ++++ : sehr starkes Immunsignal; ne : nicht untersucht

	pan-Arginase		Yu	Braissant
	Neurone	Neuropil	Arginase1-Protein	Arginase2-mRNA
Telencephalon				
Neocortex- Parietaler Cortex	++++	++	+++	++
Piriformer Cortex	++++	++	+++	++
Bulbus olfactorius	++	+++	+	++
Corpus callosum	-	-	ne	+
<i>Basalganglien</i>				
Caudate-Putamen = Striatum	+++	+++	++	++
Lateraler Globus pallidus	++ / +++	++	+	++
Medialer Globus pallidus	++	-	+	++
Ncl. accumbens	++	+++	ne	++
<i>Hippocampus</i>				
CA1	++++	+	+++	+++
CA2	+++	+	+++	+++
CA3	++	+	+++	+++
Gyrus dentatus	+++	+	++	+++
Diencephalon				
<i>Epithalamus</i>				
Ncl. habenularis medialis	++++	+++	++	ne
Ncl. habenularis lateralis, medialer Teil	+++	++ / +++	ne	ne
Ncl. habenularis lateralis, lateraler Teil	++ / +++	++	ne	ne
<i>Thalamus</i>				
Stria medullaris	(+)	+	ne	++
Ncl. dorsalis lateralis, dorsomedialer Teil	+	++	ne	++
Ncl. dorsalis lateralis, ventrolateraler Teil	++	++	ne	++
Ncl. lateralis posterior, laterocaudaler Teil	+	+ / ++	ne	++
Ncl. lateralis posterior, laterorostraler Teil	+	+ / ++	ne	++

	pan-Arginase		Yu	Braissant
	Neurone	Neuropil	Arginase1- Protein	Arginase2- mRNA
Ncl. paraventricularis	+++	++	++	ne
Ncl. anterodorsalis	+ / ++	+	++	ne
Ncl. ventralis anterior	+	+	ne	ne
Rhomboider Nucleus	+	+	++	ne
Ncl. reuniens	(+)	+	++	ne
Ncl. reticularis	++	++	++	ne
<i>Hypothalamus</i>				
Area hypothalamica lateralis	+	++	++	+
Area preoptica lateralis	++	++	ne	(+)
Area preoptica medialis	++	+++	ne	(+)
Ncl. supraopticus	++++	++ / +++	ne	ne
Zona incerta	++	++	++	+
Ncl. premammillaris	+	++	++	+
Ncl. mammillaris lateralis	+	++	++	ne
Ncl. mammillaris medialis	++	++	++	ne
Mesencephalon				
Substantia nigra, Pars compacta	++	++	+++	++
Substantia nigra, Pars reticulata	+ / ++	+	+	++
Ncl. ruber, Pars magnocellularis	+++	+++	+++	ne
Ncl. ruber, Pars parvocellularis	+++	+++	+++	ne
Colliculus superior	-	-	++	++
Colliculus inferior	(+)	(+)	++	++
Substantia grisea centralis	++	+++	+	ne
Tiefer mesencephaler Nucleus	++	+	+++	ne
Ncl. oculomotorius	+++	++	+++	ne
Metencephalon				
<i>Pons</i>				
Nuclei pontis (Brückenkerne)	+++	+++	+++	+
Formatio reticularis	+	+	+++	++
Locus caeruleus	++ / +++	+++	ne	++
Nuclei raphes pontis	(+) / +	+	+++	ne
Ncl. motorius nervi trigemini	++	+	+++	++
Ncl. tegmentalis dorsalis	+++	+++	++	
Nuclei olivares superiores	+++	+	++	ne
Corpus trapezoideum	-	-	+++	
Ncl. vestibularis lateralis	+	(+)	ne	++
<i>Cerebellum</i>				
Stratum moleculare	+++	++	++	+
Stratum purkinjense	++++	+ / ++	+++	-
Stratum granulosum	+++	++	+	+++

Pyramidenzellen und Interneurone der CA1-Region exprimieren sehr stark Arginase. Eine Kollokalisierung mit ODC und SpdS (Bernstein und Müller, 1999; Krauss et al., 2007) im Gehirn ist vor dem Hintergrund der Beteiligung der Arginase an der Polyaminsynthese wahrscheinlich. Yu et al. (2003) fanden Arg1 kollokalisiert mit ODC beispielsweise im Ösophagus, im Uterus, in Makrophagen der Lunge und in Lymphozyten des Thymus. Eine Kollokalisierung von Arg1 mit ODC und Ornithinaminotransferase fand sich u.a. im Epithel der Speicheldrüsen. Das Gehirn wurde dabei nicht untersucht. Die Expressionsmuster von Arginase, ODC und Ornithinaminotransferase deuten auf eine doppelte Rolle der Arg1 hin, zum einen die Produktion von Ornithin für die Polyaminsynthese und zum anderen die Regulation der Arginin-Konzentration durch den Argininabbau.

Die Kollokalisierung von Arginase und dem als Marker für bestimmte Interneurone fungierenden Calcium-bindenden Protein Parvalbumin in der hippocampalen CA1-Region unterstützt die Annahme, dass Arginase einen Beitrag zur synaptischen Plastizität leistet. Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD), die beiden häufigsten Formen neuronaler Plastizität, finden sich in der Tat in zelltypspezifischer Weise in glutamatergen Synapsen an hippocampalen GABAergen Interneuronen. LTP und LTD werden hier in Parvalbumin-positiven Interneuronen ausgeprägt. Interneurone mit ähnlichem axonalen Verzweigungsmuster, die jedoch den Cannabinoidrezeptor-1 exprimieren, zeigen keine dauerhafte Plastizität. LTP und LTD sind abhängig von NMDA-Rezeptoren und treten an Synapsen mit Kalzium-durchlässigen AMPA-Rezeptoren auf (Nissen et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass beide Arginase-Isoformen im Gehirn exprimiert werden. Darüber hinaus wurden im Hippocampus zwei Gruppen von Interneuronen mit unterschiedlichem intrazellulärem Färbungsbild immunzytochemisch gesichert. Die homogen diffuse zytosolische Markierung in den Interneuronen des Stratum pyramidale (Abb. 20, C) ist auf die Arg1-spezifische Fraktion zurück zu führen. Diese Annahme wird durch die gesicherte zytosolische Expression von Arg1, der vorherrschenden Isoform in der Leber, unterstützt. Im Gegensatz hierzu ist die Arg2 mitochondrial lokalisiert (Grody et al., 1987; Jenkinson et al., 1996; Morris et al., 1997; Braissant et al., 1999; Yu et al., 2001). Eine begrenzte Expression von Arg1 im Gehirn könnte unterhalb der Nachweisgrenze der initialen Northern Blot Experimente liegen, welche Arg1 ausschließlich in der Leber zeigten. Demgegenüber stehen die Daten zu einer ausgedehnten Verteilung von Arg2, die sich auch auf das Gehirn erstreckt

(Vockley et al., 1996; Morris et al., 1997). Ganz ähnlich wurde in einer Untersuchung zu Arginase-Isoformen bei Mäusen (Yu et al., 2001) mit Northern Blots Arg1 nur in der Leber deutlich nachgewiesen, im Gehirn jedoch nur in geringen Mengen. Arg2 wurde demgegenüber in den Nieren, aber nicht im Gehirn nachgewiesen. Allerdings konnte Arg2 deutlich in Gehirnen von Ratten (Braissant et al., 1999) und Mäusen (Yu et al., 2001) mittels In-situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen war die Expression von Arg1 in den Gehirnen von Mäusen stärker als die Expression von Arg2. Die durch in situ Hybridisierung (Braissant et al., 1999) demonstrierte hippocampale Arg2-Expression im Gehirn der Ratte stützt die vorliegenden immunozytochemischen Ergebnisse. Im Gehirn der Maus wurde immunozytochemisch ein verbreitetes Vorkommen von Arg1 nachgewiesen, wobei diese Versuche aber, wie bereits erwähnt, unter Verwendung eines unzureichend charakterisierten kommerziellen Antikörpers durchgeführt wurden (Yu et al., 2001). Eine Kolo-kalisation beider Arginase-Isoenzyme in den gleichen Neuronen sowie den gleichen Zellkompartimenten ist nicht ausgeschlossen (Cederbaum et al., 2004; Levillain et al., 2005). Auch ist es möglich, dass beide Isoformen, zeitgleich verschiedene Aufgaben erfüllen (Yu et al., 2001; Deignan et al., 2007).

Anders als die Arginase in der Leber, dient die im Gehirn exprimierte Arginase nicht dem Harnstoffzyklus (Jones et al., 1961). Mit zunehmendem Alter wurden signifikant erhöhte NOS- und Arginase-Aktivitäten in den Regionen CA1, CA2, CA3 und im Gyrus dentatus und in Teilen des Cortex nachgewiesen. Es gibt offenbar keine inverse Beziehung zwischen den Aktivitäten beider Enzyme. Außerdem fanden sich keine positiven Korrelationen zwischen der Aktivität der Enzyme und der Konzentration ihrer Produkte im Gewebe (Liu et al., 2009). Es lässt sich also vermuten, dass Arginase an Alterungsprozessen beteiligt ist (Liu et al., 2003a,b, 2004a, 2005). Betrachtet man den Hippocampus, die parahippocampale Region und den präfrontalen Cortex hinsichtlich ihrer Funktionen bei Lernen und Gedächtnisbildung, tragen die genannten altersabhängigen neurochemischen Veränderungen möglicherweise entscheidend zur Abnahme der kognitiven Funktionen im Alter bei (Liu et al., 2009).

Liu et al. (2011) und weitere Arbeitsgruppen untersuchten die Rolle von Arginin und seinen Metaboliten bei der Alzheimerkrankheit und fügten damit der Suche nach der Ursache dieser Erkrankung weitere Hypothesen hinzu. Hansmannel et al. (2010) fanden erhöhte Arg1- und Arg2-mRNA-Spiegel in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten.

In Ratten mit chronischer Epilepsie (experimentell herbeigeführt durch subkutane Verabreichung von Kainsäure) fanden Swamy et al. (2011) eine reduzierte Aktivität der Arginase, was in diesem Fall die NO-Produktion begünstigt. Die NO-Konzentration ist bei Epilepsie erhöht und an der Pathophysiologie der Excitotoxizität bei Epilepsie beteiligt.

4.3.2. Arginase-Expression in Interneuronen der Laminae II und III des Cortex cerebri

Neben Pyramidenzellen, Sternzellen und Interneuronen finden sich im Cortex noch eine Vielzahl an Gliazellen (Nieuwenhuys, 1994; DeFelipe et al., 2002). Arginase wurde in Pyramidenzellen und Interneuronen immunzytochemisch nachgewiesen (Abb. 15). Der anti-Arg1-Antikörper detektierte das Protein sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen, was die Mehrheit der zuvor vorliegenden Studienergebnisse bestätigt (Swamy et al., 1983; Braissant et al., 1999; Choi et al., 2012; Ahn et al., 2012). Arginase ließ sich hier auch in Astrozyten (Abb. 12) nachweisen. Die Polyamine Spermidin und Spermin sind ausgeprägt in Astrozyten und bestimmten Neuronenpopulationen lokalisiert (Laube und Veh, 1997). ODC und SpdS werden hingegen vorwiegend in Neuronen exprimiert, so dass Astrozyten höchstwahrscheinlich als Spermidin/Spermin-Speicher dienen, um den extrazellulären Raum von einem Überfluss an Polyaminen freizuhalten. Arginase ist somit wahrscheinlich Teil einer Polyaminsynthesekette, die hier eine gemeinsame Leistung von Neuronen und Astrozyten darstellt. Diese These wird durch den Nachweis von Transportvorgängen für Polyamine (Seiler et al. 1996; Masuko et al. 2003) untermauert. Darüber hinaus ist es denkbar, dass Arginase in Astrozyten auch der Regulation der Arginin-Konzentration in der Zelle dient oder Ornithin für die Synthese von Prolin, durch Ornithinaminotransferase, bereitstellt.

Nicht dargestellt wurde in der vorliegenden Arbeit die nachgewiesene Kollokalisierung zwischen dem Calcium bindenden Protein Calbindin und Arginase. Calbindin wurde in den Schichten I, II, III und V des Cortex beschrieben. Hier sind nahezu alle Pyramidenzellen und Interneurone sowie weite Bereiche des Neuropils positiv (Celio, 1990). Das Calcium bindende Protein stabilisiert den intrazellulären Calciumspiegel und verhindert so Proteindenaturierung, Ausfällung von Mineralen und Apoptose (Celio, 1990; Litwinowicz et al., 2003). Alle Calbindin-positiven Interneurone des Cortex sind GABAerge Zellen (Celio, 1990). Arginase ist somit möglicherweise an inhibitorischen Schaltkreisen im cerebralen Cortex beteiligt.

Bei Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson zeigen sich im Cortex pathologische Veränderungen. Auch hier wurde die Rolle der Arginase in Verbindung mit diesen Erkrankungen untersucht (Lee et al., 2003; Hansmann et al., 2010; Swamy et al., 2011). Arginase spielt bei diesen Krankheitsprozessen wegen seiner zentralen Position im Wechselspiel zwischen dem Arginin-Stoffwechsel, der NO-Produktion (über den Citrullin NO-Zyklus) und der Synthese von Polyaminen eine wichtige Rolle. Die Arginase-Expression führt durch den Verbrauch des Arginin-Vorrates und dem daraus resultierenden Rückgang der iNOS-Expression zu einer Verringerung der NO-Produktion. Interessanterweise hat NO neuroprotektive Effekte bei niedrigen Konzentrationen und neurotoxische (und möglicherweise neurodegenerative) Effekte bei zu hohen Konzentrationen (Hansmann et al., 2010). In diesem Zusammenhang kann eine Erhöhung der Arginase-Expression helfen, die NO-Produktion zu limitieren und damit das Gehirn vor Neurodegeneration zu schützen.

4.4. Arginase - wo ist die vermeintliche Schaltstelle der Polyaminsynthese im Rattengehirn lokalisiert oder die Frage nach der Relevanz beider Polyaminsynthesewege?

Im Gehirn haben Polyamine verschiedene gewebespezifische Aufgaben. Dabei beeinflussen sie die neuronale Erregbarkeit durch Modulation von Ionenkanälen und Rezeptoren (Ficker et al., 1994; Bowie und Mayer, 1995; Williams, 1997). Des Weiteren wurde das Polyaminsystem mit Krankheitsprozessen, wie Epilepsie (Laschet et al., 1999; Bell et al., 2011), psychischen Störungen (Fiori und Turecki, 2008; Chen et al., 2010) und Schlaganfall (Koenig et al., 1990; Ferchmin et al., 2000) in Zusammenhang gebracht. Die Tatsache, dass sich eine inhomogene Verteilung von Polyaminen (Laube und Veh, 1997; Laube et al., 2002) sowie der Enzyme der Polyaminsynthesewege im Gehirn findet (Bernstein und Müller, 1999; Krauss et al., 2006; Krauss et al., 2007; Bernstein et al., 2011), weist darauf hin, dass die hirnspezifischen, physiologischen Funktionen der Polyamine eher auf regionalen Wirkungen basieren.

Die zelluläre Verteilung der Polyamine sowie ihre stark regulierten Synthese- und Abbauvorgänge machen die Lokalisierung der Enzyme der Polyaminsynthesewege zur geeigneten Methode um die Beteiligung des Polyaminsystems in lokalen Stoffwechselabläufen zu untersuchen (Krauss et al., 2007). Zwei unterschiedliche Synthesewege,

über Ornithin oder Agmatin, führen zur Bildung der Polyamine in den verschiedenen Zelltypen. In beiden Fällen entsteht das Diamin Putrescin. Die jeweilige Relevanz dieser Synthesewege ist aber bislang noch nicht geklärt. In dieser Hinsicht sind die Vergleichsanalysen der Arginase- und ADC-Expression, der Enzyme, die für die Synthese von Ornithin und Agmatin verantwortlich sind, hilfreich, um die Nutzung beider Synthesewege beurteilen zu können. In einem parallelen Projekt wurde in unserer Arbeitsgruppe neben dem Antikörper gegen Arginase auch ein gegen ADC gerichteter, polyklonaler Antikörper produziert und ebenfalls zur Lokalisation dieses Enzyms im Gehirn verwendet (Peters und Berger et al., 2013). Mit Hilfe der zuvor charakterisierten Antikörper gegen SpdS (Krauss et al., 2006) und Agmatinase (Bernstein et al., 2011) wurden die jeweiligen Färbungsmuster in den einzelnen Regionen des Rattengehirns untersucht und verglichen.

Während die Bedeutung der ADC für die Polyaminsynthese kontrovers diskutiert wird (Li et al., 1995; Regunathan und Reis, 2000; Cederbaum et al., 2004; Coleman et al., 2004; Lopez-Contreras et al., 2006; Deignan et al., 2007), ist Arginase vermutlich nicht notwendig, um Ornithin für den Polyamin-Stoffwechsel in Arg1/Arg2-single- und double-knockout Mäusen bereitzustellen (Deignan et al., 2007). Das Fehlen der Enzyme hatte keinen großen Effekt auf die Gesamtornithinkonzentration in den meisten untersuchten Geweben. Eine Ausnahme, mit einer stark reduzierten Ornithinkonzentration, bildet beispielsweise die Leber der Arg1 single- und double-Knockout- Mäuse, wo große Mengen Ornithin für den Harnstoffzyklus benötigt werden. Bei Mäusen mit einer Defizienz der Arg2 zeigt sich eine minimal erhöhte Putrescinkonzentration in der Leber, während die Spermidin- und Spermin-konzentrationen normal blieben. Der generelle Mangel an regulatorischen Enzymen sowie Veränderungen der Polyaminkonzentrationen in den Geweben von Arginase-Knockout-Mäusen, lassen vermuten, dass nur ein kleiner Teil des Ornithins für die endogene Polyaminsynthese benötigt wird. Ausreichend Ornithin wird möglicherweise von bisher unbekanntem Enzymen bereitgestellt. Alternative Quellen, wie die Nahrung, können eine ausreichende Polyaminversorgung sicherstellen (Larqué et al., 2007). Welche Rolle Speziesunterschiede und der alternative Polyaminsyntheseweg dabei spielen, wurde bisher nicht geklärt. Diskutiert wird die Aufrechterhaltung der Blut- und Gewebepolyaminspiegel (Leber, Gehirn, Nieren und Dünndarm) durch über die Nahrung zugeführtes Spermidin, Spermin und Agmatin (Deignan et al., 2007; Pegg, 2009). Im Gehirn herrschen, vermutlich aufgrund der Blut-Hirnschranke, andere Polyaminspiegel als im Serum vor. Anscheinend haben Putrescin,

Spermidin und Spermin nur eine begrenzte Möglichkeit, diese Schranke zu durchqueren (Shin et al., 1985). Piletz et al. (2003) zeigten dagegen, dass Agmatin und sein Vorläufer Arginin die Blut-Hirn-Schranke überqueren. Die theoretischen Bezugsquellen von Agmatin für das Gehirn sind daher peripheres Agmatin und Arginin sowie die endogene Synthese sowohl in der Peripherie als auch im Gehirn selbst durch das induzierbare Enzym ADC (Piletz et al., 2003). Es wird jedoch angenommen, dass das Agmatin im Gehirn eher aus der Nahrung als aus internen Quellen stammt (Cederbaum et al., 2004; Pegg, 2009). Über den Stoffaustausch zwischen Gehirn und Blut gelangt endogen im Gehirn synthetisiertes Agmatin ins Blut. Beispielsweise wurden bei depressiven Patienten höhere und nach der Therapie normale Agmatinkonzentrationen im Blut beobachtet, was auf eine Quelle im ZNS schließen lässt (Piletz et al., 2003).

Beide Arginase-Isoformen werden im Gehirn exprimiert. In dieser Arbeit wurden im Hippocampus zwei Gruppen von Interneuronen mit unterschiedlichem intrazellulärem Färbungsbild nachgewiesen. Unter Nutzung des Virtual Pre-embeddings (Madai et al., 2012), für die Darstellung der Arginase-Immunreaktivität, wurden punktförmige Muster markiert, die zum Teil an dendritische Strukturen angrenzen (Peters und Berger et al., 2013). Dies deutet auf eine synaptische Lokalisation der Arginase hin. Die präsynaptische Lokalisation spricht für eine Polyaminsynthese an Synapsen. Interessanterweise wurde die SpdS zuvor ebenfalls in präsynaptischen Nervenendigungen nachgewiesen (Krauss et al., 2007). Arg2 wird als mitochondriales Enzym angesehen, da sie eine N-terminale Leader-Sequenz für Mitochondrien aufweist (Gotoh et al., 1996; Morris et al., 1997; Iyer et al., 1998; Levillain et al., 2005). Eine eindeutige subzelluläre Lokalisation der Arginase ist lichtmikroskopisch schwierig. Verhindert wird dies möglicherweise durch die begrenzte Penetration des Antikörpers über die mitochondrialen Membranen hinweg. Das somatische Immunsignal wurde hier vorzugsweise mit dem Golgi-Apparat, inklusive der prä- und post-Golgivesikel, in Verbindung gebracht (Peters und Berger et al., 2013). Levillain et al. (2005) wiesen bereits eine geringgradige zytosolische Lokalisation von Arg2 nach.

Entsprechend der Arginase wurde auch ADC somafern an Postsynapsen nachgewiesen (Peters und Berger et al., 2013). Dies untermauert die These, dass Polyaminsynthese an Synapsen stattfindet. Da für Agmatin eine wichtige Funktion als Neurotransmitter postuliert wird, ist die lokale Expression eines synthetisierenden Enzyms, wie ADC sowie eines abbauenden Enzyms wie Agmatinase (Madai et al., 2012),

in synaptischen Kompartimenten notwendig, um spezifische Funktionen im Gehirn zu erfüllen.

Die beobachteten Verteilungsmuster von Arginase/SpdS und ADC/Agmatinase sprechen eher gegen die Annahme, dass die ADC einen alternativen Weg für die Polyaminsynthese darstellt (Peters und Berger et al., 2013). Anscheinend exprimieren viele zentrale Neurone die Enzyme beider Polyaminsynthesewege. Agmatin ist ein potentieller Neurotransmitter und die Regulation von Agmatin, die in Verbindung mit affektiven Störungen steht (Fiori und Turecki, 2008; Bernstein et al., 2012), scheint der eigentliche Zweck des alternativen Polyaminsyntheseweges zu sein. Demzufolge dient Agmatinase im Gehirn vermutlich als Agmatininaktivator und nicht als Putrescinquelle.

Literaturverzeichnis

van Leeuwenhoek Antonie. *Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de Natis e semine genitali Animalculis*. Philos. Trans. R.Soc. 1678;1040-1043.

Agostinelli E, Arancia G, Dalla Vedova L, Belli F, Marra M, Salvi M, Toninello A. The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids* 2004;27:347-358.

Agostinelli E, Belli F, Molinari A, Condello M, Palmigiani P, Dalla Vedova L, Marra M, Seiler N, Arancia G. Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (M14): sensitisation by heat and MDL 72527. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:1040-1050.

Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem*. 2006;281(13):8991-5.

Ahn M, Lee C, Jung K, Kim H, Moon C, Sim KB, Shin T. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of rats with clip compression injury. *Brain Res*. 2012;1445:11-9.

Antony T, Hoyer W, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V. Cellular polyamines promote the aggregation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2003;278(5):3235-3240.

Babbar N, Murray-Stewart T, Casero RA, Jr. Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 2):300-304.

Bachrach U, Wang YC, Tabib A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci* 2001;16:106-109.

Bachrach U. Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids* 2004;26(4):307-309.

Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response.

Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2003;6(2):223-8.

Bell MR, Belarde JA, Johnson HF, Aizenman CD. A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):505-12.

Benedikt J, Inyushin M, Kucheryavykh YV, Rivera Y, Kucheryavykh LY, Nichols CG, Eaton MJ, Skatchkov SN. Intracellular polyamines enhance astrocytic coupling. *Neuroreport*. 2012;23(17):1021-5. doi: 10.1097/WNR.0b013e32835aa04b.

Bernstein HG, Müller M. The cellular localization of the L-ornithine decarboxylase/polyamine system in normal and diseased central nervous systems. *Prog Neurobiol*. 1999;57(5):485-505.

Bernstein HG, Derst C, Stich C, Prüss H, Peters D, Krauss M, Bogerts B, Veh RW, Laube G. The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain? *Amino Acids*. 2011;40(2):453-65.

Bernstein HG, Stich C, Jäger K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G. Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):237-46.

Bonaparte KL, Hudson CA, Wu C, Massa PT. Inverse regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase I by the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in CNS glia. *Glia*. 2006;53(8):827-35.

Bowie D, Mayer ML. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*. 1995;15(2):453-62.

Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C. L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;70(2):231-41.

Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):641-54.

Carvalho DR, Brum JM, Speck-Martins CE, Ventura FD, Navarro MM, Coelho KE, Portugal D, Pratesi R. Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia. *Pediatr Neurol.* 2012;46(6):369-74.

Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab.* 2004;81 Suppl 1:S38-44.

Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* 1990;35(2):375-475.

Chen GG, Fiori LM, Moquin L, Gratton A, Mamer O, Mechawar N, Turecki G. Evidence of altered polyamine concentrations in cerebral cortex of suicide completers. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(7):1477-84.

Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW. Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003;60:1394-1406.

Choi S, Park C, Ahn M, Lee JH, Shin T. Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats. *Acta Histochem.* 2012;114(5):487-94.

Coleman CS, Hu G, Pegg AE. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem J.* 2004;379(Pt 3):849-55.

Colton CA, Xu Q, Burke JR, Bae SY, Wakefield JK, Nair A, Strittmatter WJ, Vitek MP. Disrupted spermine homeostasis: a novel mechanism in polyglutamine-mediated aggregation and cell death. *J Neurosci* 2004;24(32):7118-7127.

DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol.* 2002;31(3-5):299-316. Review.

Deignan JL, Livesay JC, Shantz LM, Pegg AE, O'Brien WE, Iyer RK, Cederbaum SD, Grody WW. Polyamine homeostasis in arginase knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(4):C1296-301.

Dudley HW, Rosenheim MC, Rosenheim O. The chemical constitution of spermine. 1. The isolation of spermine from animal tissues and the preparation of its salts. *Biochem. J.* 1924;1263-1272.

Dudley, H.W., Rosenheim, O. and Starling, W.W. The chemical constitution of spermine. 3. Structure and synthesis. *Biochem. J.* 1926;1082-1094.

Ferchmin PA, Pérez D, Biello M. Spermine is neuroprotective against anoxia and N-methyl-D-aspartate in hippocampal slices. *Brain Res.* 2000;859(2):273-9.

Ferger AI, Campanelli L, Reimer V, Muth KN, Merdian I, Ludolph AC, Witting A. Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia. *J Neuroinflammation.* 2010;7:45.

Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science.* 1994;266(5187):1068-72.

Fiori LM, Turecki G. Implication of the polyamine system in mental disorders. *J Psychiatry Neurosci.* 2008;33(2):102-10.

Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(9):427-38.

Fujiwara K, Bai G, Kitagawa T. Polyamine-like immunoreactivity in rat neurons. *Brain Res.* 1997;767(1):166-71.

Gerner, EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 2004;4:781-792.

Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett.* 1996;395(2-3):119-22.

Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233(2):487-91.

Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol.* 1999;144(3):427-34.

Gratacos E, Perez-Navarro E, Tolosa E, Arenas E, Alberch J. Neuroprotection of striatal neurons against kainate excitotoxicity by neurotrophins and GDNF family members. *J Neurochem* 2001;78(6):1287-1296.

Grillo MA, Colombatto S. Arginine revisited: minireview article. *Amino Acids.* 2004;26(4):345-51.

Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD. Human arginase isozymes. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 1987;13:181-214.

Hansmannel F, Sillaire A, Kamboh MI, Lendon C, Pasquier F, Hannequin D, Laumet G, Mounier A, Ayrat AM, DeKosky ST, Hauw JJ, Berr C, Mann D, Amouyel P, Campion D, Lambert JC. Is the urea cycle involved in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis.* 2010;21(3):1013-21.

Hobbs CA, Paul BA, Gilmour SK. Deregulation of polyamine biosynthesis alters intrinsic histone acetyltransferase and deacetylase activities in murine skin and tumors. *Cancer Res.* 2002;62(1):67-74.

Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, Grody WW, Cederbaum S. The human arginases and arginase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1998;21 Suppl 1:86-100.

Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, Yu H, Grody WW, Cederbaum SD. Mouse model for human arginase deficiency. *Mol Cell Biol.* 2002;22(13):4491-8.

Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1996;114(1):107-32.

Jones ME, Anderson AD, Anderson C, Hodes S. Citrulline synthesis in rat tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1961;95:499-507.

Junttila T, Hietanen-Peltola M, Rechart L, Persson L, Hökfelt T, Pelto-Huikko M. Ornithine decarboxylase-like immunoreactivity in rat spinal motoneurons and motoric nerves. *Brain Res.* 1993;609(1-2):149-53.

Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Wu G, Morris SM Jr. Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(6):R2237-42.

Kilpeläinen P, Rybnikova E, Hietala O, Pelto-Huikko M. Expression of ODC and its regulatory protein antizyme in the adult rat brain. *J Neurosci Res.* 2000;62(5):675-85.

Koenig H, Goldstone AD, Lu CY, Trout JJ. Brain polyamines are controlled by N-methyl-D-aspartate receptors during ischemia and recirculation. *Stroke.* 1990;21(11 Suppl):III98-102.

Kramer DL, Vujcic S, Diegelman P, White C, Black JD, Porter CW. Polyamine analogue-mediated cell cycle responses in human melanoma cells involves the p53, p21, Rb regulatory pathway. *Biochem Soc Trans.* 1998;26(4):609-14.

Krauss M, Langnaese K, Richter K, Brunk I, Wieske M, Ahnert-Hilger G, Veh RW, Laube G. Spermidine synthase is prominently expressed in the striatal patch compartment and in putative interneurons of the matrix compartment. *J Neurochem.* 2006;97(1):174-89.

Krauss M, Weiss T, Langnaese K, Richter K, Kowski A, Veh RW, Laube G. Cellular and subcellular rat brain spermidine synthase expression patterns suggest region-specific roles for polyamines, including cerebellar pre-synaptic function. *J Neurochem.* 2007;103(2):679-93.

Kucheryavykh YV, Shuba YM, Antonov SM, Inyushin MY, Cubano L, Pearson WL, Kurata H, Reichenbach A, Veh RW, Nichols CG, Eaton MJ, Skatchkov SN. Complex rectification of Müller cell Kir currents. *Glia.* 2008;56(7):775-90. doi: 10.1002/glia.20652.

Lange PS, Langley B, Lu P, Ratan RR. Novel roles for arginase in cell survival, regeneration, and translation in the central nervous system. *J Nutr.* 2004;134(10 Suppl):2812S-2817S; discussion 2818S-2819S.

Larque E, Sabater-Molina M, and Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition.* 2007;23: 87-95.

Laschet J, Trottier S, Levie V, Guibert B, Bansard JY, Chauvel P, Bureau M. Heterogeneous distribution of polyamines in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999;35(2):161-72.

Laube G, Veh RW. Astrocytes, not neurons, show most prominent staining for spermidine/spermine-like immunoreactivity in adult rat brain. *Glia.* 1997;19(2):171-9.

Laube G, Bernstein HG, Wolf G, Veh RW. Differential distribution of spermidine/spermine-like immunoreactivity in neurons of the adult rat brain. *J Comp Neurol.* 2002;444(4):369-86.

Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4843-8.

Levillain O, Balvay S, Peyrol S. Mitochondrial expression of arginase II in male and female rat inner medullary collecting ducts. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(4):533-41.

Li G, Regunathan S, Reis DJ. Agmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;763:325-9.

Li H, Meininger CJ, Hawker JR, Jr., Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM, Jr., Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(1):E75-82.

Li L, Li J, Rao JN, Li M, Bass BL, Wang JY. Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276(4 Pt 1):C946-54.

Litwinowicz B, Labuda C, Kowiański P, Spodnik JH, Ludkiewicz B, Wójcik S, Moryś J. Developmental pattern of calbindin D28k protein expression in the rat striatum and cerebral cortex. *Folia Morphol (Warsz).* 2003 Nov;62(4):327-9.

Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Nitric oxide synthase and arginase in the rat hippocampus and the entorhinal, perirhinal, postrhinal, and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Hippocampus.* 2003a;13(7):859-67.

Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience.* 2003b;119(3):679-87.

Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiol Aging.* 2004a;25(4):547-52.

Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Hippocampal nitric oxide synthase and arginase and age-associated behavioral deficits. *Hippocampus.* 2005;15(5):642-55.

Liu P, Jing Y, Zhang H. Age-related changes in arginine and its metabolites in memory-associated brain structures. *Neuroscience.* 2009;164(2):611-28.

Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;372(6504):366-369.

López-Contreras AJ, López-García C, Jiménez-Cervantes C, Cremades A, Peñafiel R. Mouse ornithine decarboxylase-like gene encodes an antizyme inhibitor devoid of ornithine and arginine decarboxylating activity. *J Biol Chem*. 2006;281(41):30896-906.

Lu L, Bonham CA, Chambers FG, Watkins SC, Hoffman RA, Simmons RL, Thomson AW. Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol*. 1996;157(8):3577-86.

Madai VI, Poller WC, Peters D, Berger J, Paliege K, Bernard R, Veh RW, Laube G. Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding. *Amino Acids*. 2012;43(3):1399-403.

Masuko T, Kusama-Eguchi K, Sakata K, Kusama T, Chaki S, Okuyama S, Williams K, Kashiwagi K, Igarashi K. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J Neurochem*. 2003;84(3):610-7.

Meyskens FL Jr, Gerner EW. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin Cancer Res*. 1999;5(5):945-51.

Miyataka K, Gotoh T, Nagasaki A, Takeya M, Ozaki M, Iwase K, Takiguchi M, Iyama KI, Tomita K, Mori M. Immunohistochemical localization of arginase II and other enzymes of arginine metabolism in rat kidney and liver. *Histochem J*. 1998;30(10):741-51.

Mori M, Gotoh T. Relationship between arginase activity and nitric oxide production. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide. Biology and Pathology*. San Diego, CA: Academic Press; 2000:199–208.

Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr*. 2004;134(10 Suppl):2820S-2825S.

Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr.* 2007;137(6 Suppl 2):1616S-1620S.

Morris Jr Sm, Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D. Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 1997;193:157-161.

Morris SM., Jr . Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide. Biology and Pathobiology.* San Diego, CA: Academic Press; 2000:187–197.

Morris SM Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):508S-512S.

Morris SM Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol.* 2009;157(6):922-30.

Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell Mol Biol.* 1991;37: 773–783.

Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 1999;163(7):3771-7.

Narisawa T, Takahashi M, Niwa M, Koyama H, Kotanagi H, Kusaka N, Yamazaki Y, Nagasawa O, Koyama K, Wakizaka A, et al. Increased mucosal ornithine decarboxylase activity in large bowel with multiple tumors, adenocarcinoma, and adenoma. *Cancer.* 1989;63(8):1572-6.

Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:171-91.

Nieuwenhuys R. The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol (Berl).* 1994;190(4):307-37.

Nishimura K, Nakatsu F, Kashiwagi K, Ohno H, Saito T, Igarashi K. Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. *Genes Cells*. 2002;7(1):41-7.

Nishioka K, Grossie VB, Chang TH, Ajani JA, Ota DM. Colorectal ornithine decarboxylase activity in human mucosa and tumors: elevation of enzymatic activity in distal mucosa. *J Surg Oncol*. 1991;47(2):117-20.

Nissen W, Szabo A, Somogyi J, Somogyi P, Lamsa KP. Cell type-specific long-term plasticity at glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons expressing either parvalbumin or CB1 cannabinoid receptor. *J Neurosci*. 2010;30(4):1337-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3481-09.2010.

Oliver D, Baukrowitz T, Fakler B. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem*. 2000 Oct;267(19):5824-9.

Ozaki M, Gotoh T, Nagasaki A, Miyanaka K, Takeya M, Fujiyama S, Tomita K, Mori M. Expression of arginase II and related enzymes in the rat small intestine and kidney. *J Biochem*. 1999;125(3):586-93.

Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res*. 1988;48(4):759-74.

Pegg AE, Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 2009;61(9):880-94.

Pendeville H, Carpino N, Marine JC, Takahashi Y, Muller M, Martial JA, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol*. 2001;21(19):6549-58.

Peters D, Berger J, Langnaese K, Derst C, Madai VI, Krauss M, Fischer KD, Veh RW, Laube G. Arginase and Arginine Decarboxylase - Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain? *PLoS One*. 2013 Jun 19;8(6):e66735. Print 2013.

Piletz JE, May PJ, Wang G, Zhu H. Agmatine crosses the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1009:64-74.

Pradidarcheep W, Labruyère WT, Dabhoiwala NF, Lamers WH Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(12):1099-111.

Ransom RW, Stec NL. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D- aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem*1988;51(3):830-836.

Raspaud E, Olvera de la Cruz M, Sikorav JL, Livolant F. Precipitation of DNA by polyamines: a polyelectrolyte behavior. *Biophys J.* 1998;74(1):381-93.

Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR. Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 1):C684-91.

Rea G, Bocedi A, Cervelli M. Question: What is the biological function of the polyamines? *IUBMB Life.* 2004;56(3):167-9.

Regunathan S, Reis DJ. Characterization of arginine decarboxylase in rat brain and liver: distinction from ornithine decarboxylase. *J Neurochem.* 2000;74(5):2201-8.

Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev.* 2008;222:180-91.

Russell D, Snyder SH. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60(4):1420-7.

Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(1):1-5.

Sarkar T, Petrov AS, Vitko JR, Santai CT, Harvey SC, Mukerji I, Hud NV. Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. *Biochemistry*. 2009;48(4):667-75. doi: 10.1021/bi8019965.

Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AA. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol*. 2000;10(1):55-68.

Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28(8):843-61.

Shi O, Morris SM Jr, Zoghbi H, Porter CW, O'Brien WE. Generation of a mouse model for arginase II deficiency by targeted disruption of the arginase II gene. *Mol Cell Biol*. 2001;21(3):811-3.

Shin WW, Fong WF, Pang SF, Wong PC. Limited blood-brain barrier transport of polyamines. *J Neurochem*. 1985;44(4):1056-9.

Spector EB, Jenkinson CP, Grigor MR, Kern RM, Cederbaum SD. Subcellular location and differential antibody specificity of arginase in tissue culture and whole animals. *Int J Dev Neurosci*. 1994;12(4):337-42.

Sträter J, Walczak H, Hasel C, Melzner I, Leithäuser F, Möller P. CD95 ligand (CD95L) immunohistochemistry: a critical study on 12 antibodies. *Cell Death Differ*. 2001;8(3):273-8.

Swamy M, Shrivastaw KP, Prasad MS, Sadasivudu B. Activities of arginase, transamidinase, and ornithine aminotransferase in glia, neurons, and synaptosomes. *J Neurosci Res*. 1983;10(4):363-8. Abstract

Swamy M, Yusof WR, Sirajudeen KN, Mustapha Z, Govindasamy C. Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. *J Physiol Biochem*. 2011;67(1):105-13.

Tadolini B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem J.* 1988;249(1):33-6.

Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanism and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58:244-258.

Todd BA, Parsegian VA, Shirahata A, Thomas TJ, Rau DC, Attractive forces between cation condensed DNA double helices. *Biophys J* 2008;94:4775–4782.

Vockley JG, Jenkinson CP, Shukla H, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics.* 1996;38(2):118-23.

Wang X, Ikeguchi Y, McCloskey DE, Nelson P, Pegg AE. Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse. *J Biol Chem* 2004;279(49):51370-51375.

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 2003;376:1-14.

Wallace HM, Fraser AV. Inhibitors of polyamine metabolism: review article. *Amino Acids.* 2004;26(4):353-65.

Wallace HM. The polyamines: past, present and future. *Essays Biochem* 2009;46:1-9.

Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 2001:365–391.

Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sciences* 1991;48:469-498.

Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 1997 Jul 15;325 (Pt 2):289-97. Review. Erratum in: *Biochem J* 1997 Sep 15;326(Pt 3):943.

Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 1):1-17.

Yu H, Iyer RK, Kern RM, Rodriguez WI, Grody WW, Cederbaum SD. Expression of arginase isozymes in mouse brain. *J Neurosci Res* 2001;66(3):406-422.

Yu H, Yoo PK, Aguirre CC, Tsoa RW, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD, Iyer RK. Widespread expression of arginase I in mouse tissues. Biochemical and physiological implications. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(9):1151-60.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Berger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Zur Lokalisation der Arginase im Gehirn der Ratte selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jana Berger hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Madai VI, Poller WC, Peters D, Berger J, Paliege K, Bernard R, Veh RW, Laube G. Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding. Amino Acids. 2012;43(3):1399-403.

Beitrag im Einzelnen:

- 10%
- kritische Beiträge zur fachlichen Diskussion

Publikation 2: Peters D, Berger J, Langnaese K, Derst C, Madai VI, Krauss M, Fischer KD, Veh RW, Laube G. Arginase and Arginine Decarboxylase - Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain? PLoS One. 2013 Jun 19;8(6):e66735. Print 2013.

Beitrag im Einzelnen:

- 40%
- Charakterisierung des anti-Arg1-Antikörpers
- Erhebung sämtlicher experimenteller Daten zum anti-Arg1-Antikörper
- Manuskript- und Abbildungsentwürfe

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Paper

1. Madai VI, Poller WC, Peters D, **Berger J**, Paliege K, Bernard R, Veh RW, Laube G. Synaptic localisation of agmatinase in rat cerebral cortex revealed by virtual pre-embedding. *Amino Acids*. 2012;43(3):1399-403.
2. Peters D, **Berger J**, Langnaese K, Derst C, Madai VI, Krauss M, Fischer KD, Veh RW, Laube G. Arginase and Arginine Decarboxylase - Where Do the Putative Gate Keepers of Polyamine Synthesis Reside in Rat Brain? *PLoS One*. 2013 Jun 19;8(6):e66735. Print 2013.

Kongressbeitrag

Daniela Peters, Jana Berger, Christian Derst, Rüdiger W. Veh, Gregor Laube (2011)

Arginase and arginine decarboxylase – where do the gate keepers of polyamine synthesis reside in rat brain?

Annual Meeting of the German Neuroscience Society (2011), Göttingen

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mir durch Ihre Unterstützung geholfen haben, diese Arbeit zu erstellen. Danke für eure tolle Hilfe, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Veh für sein Vertrauen und die Überlassung dieses interessanten Themas und seine fachkundige Betreuung. Dafür, dass ich dadurch im Institut arbeiten durfte und gelernt habe wissenschaftlich zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gregor Laube, der mich in meiner wissenschaftlichen Entwicklung enorm weiter gebracht hat und durch diese Arbeit mein wissenschaftliches Denken gefördert und gefordert hat.

Vielen Dank an Herrn Dr. Christian Derst und Herrn Dr. Torsten Weiß, die sich immer die Zeit genommen haben mir zu helfen und meine Fragen geduldig zu beantworten.

Ich danke herzlichst Frau Dr. Christiane Marinc, die mir eine sehr gute Freundin geworden ist, dafür, dass sie ihre Freizeit geopfert hat um mein Manuskript zu lesen und die Korrekturen mit mir zu besprechen.

Frau Dr. Kristina Langnäse, Frau Berit Söhl-Kielczynski, Frau Semanur Ünsal und Frau Britta Laube danke ich dafür, dass ich von Ihrem Fachwissen profitieren durfte und für die Unterstützung bei meinen Laborarbeiten.

Vielen Dank an Frau Annett Kaphan für die aufmunternden Worte, das Korrekturlesen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei meiner Kommilitonin, Freundin und Leidensgenossin Frau Daniela Peters dafür, dass wir bis zum Ende dieses gemeinsame Projekt bestritten haben.

Abschließend danke ich von ganzem Herzen meiner Familie und meinen Freunden. Vielen Dank für euer Vertrauen und Verständnis. Vielen Dank für die viele Zeit, die ich euch gekostet habe und die ihr mir gegeben habt. Danke, dass ihr meine Launen ertragen habt und mir auch durch die schlimmsten Stunden hindurch geholfen habt. Ihr habt mir immer wieder neue Kraft und neuen Mut gegeben dieses Projekt erfolgreich zu beenden.