

3. Ergebnisse

3.1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die iNOS - Expression in humanen Monozyten nach Stimulation mit IFN γ und LPS untersucht. Dies diente dazu, für die weiterführenden Versuche eine optimale Inkubationszeit und Konzentration von IFN γ und LPS zu finden, bei der die iNOS - Expression signifikant und reproduzierbar die basale Expression überschreitet. Ziel der weiteren Experimente war es, den Einfluss des Plasmas von Dialysepatienten und gesunden Kontrollpersonen auf die iNOS - mRNA - Synthese zu untersuchen. Mittels Magnetresonanzspektroskopie konnte PAA als im Dialyseplasma akkumulierende Substanz nachgewiesen werden, so dass sich die weiteren Untersuchungen den PAA - Effekten auf die iNOS - Expression in humanen Monozyten widmete (Abschnitt 3.2 bis 3.4)

Um die funktionelle Relevanz der gefundenen Effekte zu untersuchen, wurde die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 genutzt. Diese bietet neben der leichteren Verfügbarkeit den Vorteil, dass aufgrund der grösseren Zellmenge und der leichteren Kultivierbarkeit die Effekte des exprimierten Enzyms direkt gemessen werden können. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen nicht nur die mRNA - Expression gemessen, sondern mittels Western - Blot und Messung der Nitritmenge im Kulturmedium als Ausdruck der synthetisierten NO - Menge auch die direkten Auswirkungen der gesteigerten resp. gehemmte iNOS - Aktivität (Abschnitt 3.5. - 3.8.)

3.2. Stimulation der iNOS - Synthese durch IFN γ und LPS und Inhibition durch Dialyseplasma

Nach Isolation von Monozyten aus heparinisiertem Vollblut gesunder Probanden mittels Dichtezentrifugation wurden die Zellen mit IFN γ und LPS stimuliert. Wie in Abb. 5 dargestellt, kam es nach 6 Stunden Stimulation durch 100 U/ml IFN γ und 1 μ g/ml LPS zu einer signifikanten Zunahme der iNOS - mRNA - Synthese. Die höhere iNOS - Expression zum Zeitpunkt 0 h im Vergleich zum 2 h - Wert ist auf eine Aktivierung der iNOS - Expression durch den Isolationsprozess zurückzuführen. Es zeigt sich auch, dass über die Zeit eine Aktivierung der iNOS - Expression auch in unstimulierten Zellen

zu verzeichnen ist; diese ist aber bei weitem nicht so ausgeprägt wie der Effekt durch Stimulation mit LPS und $\text{IFN}\gamma$.

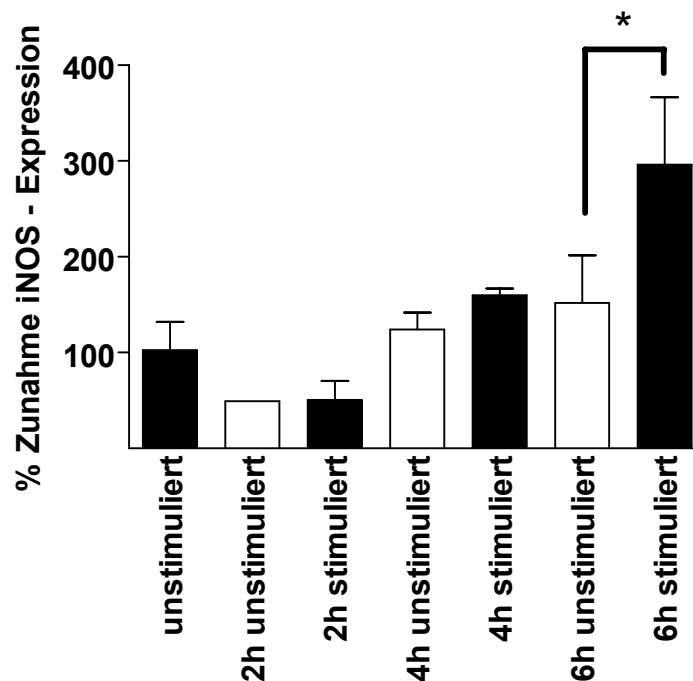
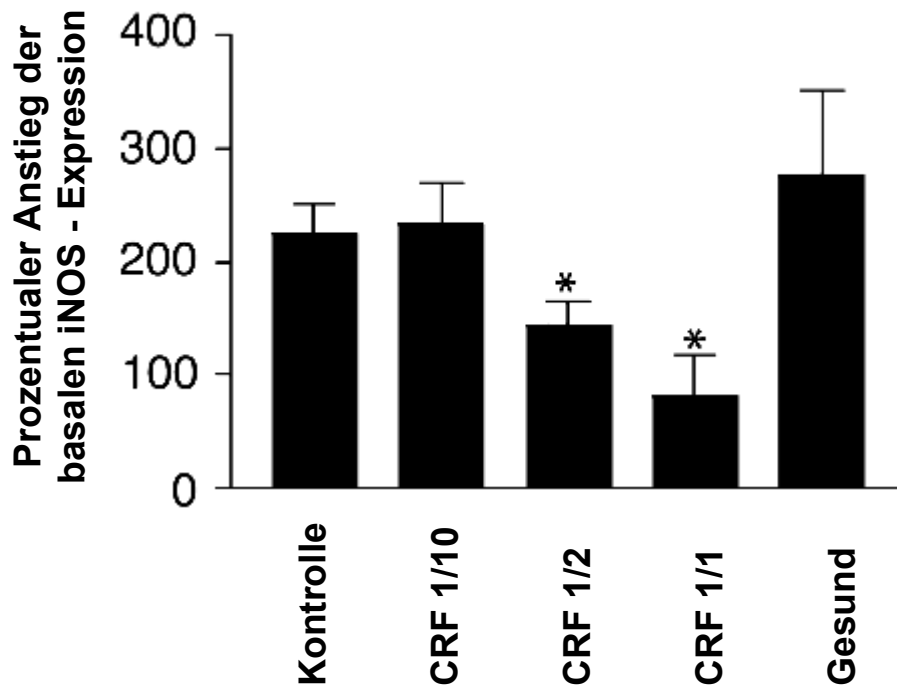


Abbildung 5: Expression der iNOS - mRNA in humanen Monozyten über die Zeit nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS und 100 u/ml $\text{IFN}\gamma$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n =10; * $p < 0.05$)

Das Ersetzen des Kulturmediums durch Blutplasma von Dialysepatienten, das durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen wurde, sollte die Wirkung auf die iNOS - Expression zeigen. Dazu wurde das Plasma mit physiologischer NaCl - Lösung auf 1/10 bzw. 1/2 verdünnt. Ein dritter Ansatz nutzte das unverdünnte Plasma. Um auszuschließen, dass die ermittelten Effekte eine unspezifische Reaktion auf Plasma von Fremdpersonen sind, wurde in einem vierten Ansatz das unverdünnte Plasma einer gesunden Kontrollperson verwendet. Es zeigte sich, dass davon die iNOS - mRNA - Expression unbeeinflusst blieb, während das Plasma von Dialysepatienten einen anteilsabhängigen, hemmenden Effekt zeigte. Die Resultate sind in Abbildung 6 dargestellt.

**Abbildung 6:**

Prozentuale Steigerung der basalen iNOS - Expression unter dem Einfluss des Plasmas von Dialysepatienten. (Zellen 6h unstimuliert = 100%; *Kontrolle*: humane Monozyten, stimuliert über 6 h mit 100 u/ml IFN gamma und 1 ug/ml LPS; *CRF*: Plasma von Dialysepatienten, verdünnt mit physiologischer NaCl - Lösung in entsprechenden Mengenanteilen; *Gesund*: Plasma gesunder Kontrollpersonen). Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (n=6, * p< 0.05).

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte unter Nutzung gaschromatographischer und massenspektroskopischer Verfahren die die iNOS - Expression beeinflussende Substanz als Phenylacetylsäure (PAA) identifiziert werden, so dass diese Substanz einer weitergehenden Betrachtung unterzogen wurde. Im Plasma gesunder Personen konnte PAA nicht nachgewiesen werden. Im Plasma von Dialysepatienten fand sich hingegen eine Konzentration von 3,49 +/- 0,33 mmol/l (Jankowski et al., 2003).

3.3. Untersuchung der Effekte von PAA auf die iNOS - Expression

Zunächst richtete sich das Augenmerk auf die direkten Effekte unterschiedlicher PAA - Konzentrationen im Kulturmedium auf die Expression der iNOS – mRNA in humanen Monozyten. Dabei zeigte sich eine Blockade der iNOS - mRNA - Synthese in Abhängigkeit von der PAA – Konzentration (Abbildung 7).

Konzentrationen höher als 2 mmol/l führten zu einem erneuten Anstieg der iNOS – Expression. Dies ist möglicherweise auf einen direkt zytotoxischen Effekt des PAA bzw. eine Aktivierung der iNOS - Expression durch den durch PAA erniedrigten pH - Wert. zurückzuführen (Huang et al., 2002).

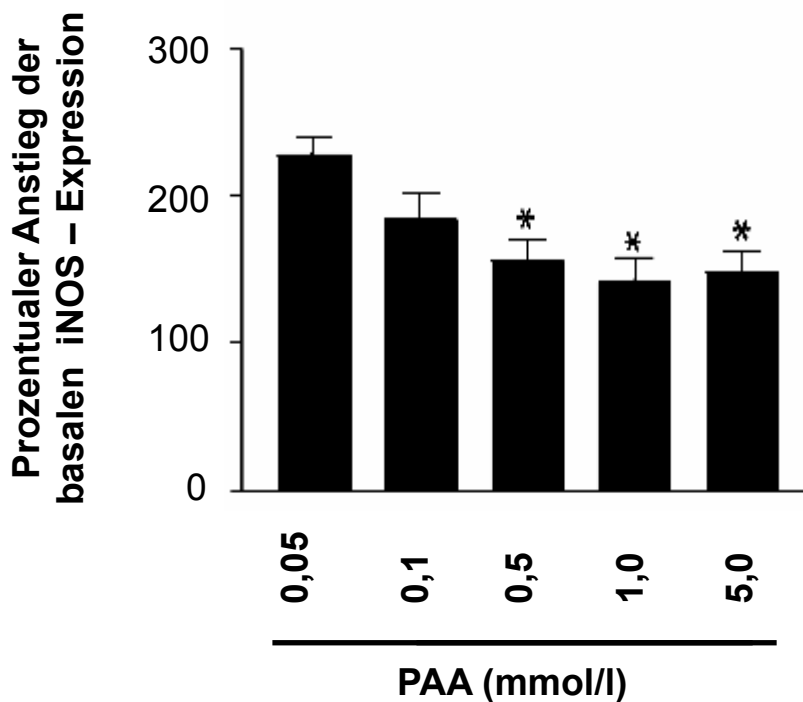


Abbildung 7:

Effekt unterschiedlicher PAA - Konzentrationen auf die mit IFN γ und LPS - stimulierte iNOS - Expression. Die basal unstimulierte iNOS - Expression nach 6 h Kultivierung wurde als 100% gesetzt. Alle Werte als Mittelwerte \pm SEM (n=6, * p < 0.05, verglichen mit basaler iNOS - Expression).

3.4. Wirkung verschiedener Phenylalaninderivate auf die iNOS - Expression

PAA entstammt dem Phenylalaninstoffwechsel (Oberdoerster et al., 2000). Um auszuschliessen, dass die gefundene hemmende Wirkung auf die iNOS - Expression ein Gruppeneffekt ist, wurden dem Kulturmedium verschiedene Phenylalaninderivate (Phenylalanin, Homogentisinsäure und Phenylethylamin) in einer Konzentration von 1 mmol/l zugesetzt. Der Zusatz von PAA in einer Konzentration von 1mmol/l zum Kulturmedium diente als Kontrolle. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein hemmender Einfluss der Phenylalaninderivate auf die IFN γ und LPS - induzierte iNOS - Expression (Abbildung 8).

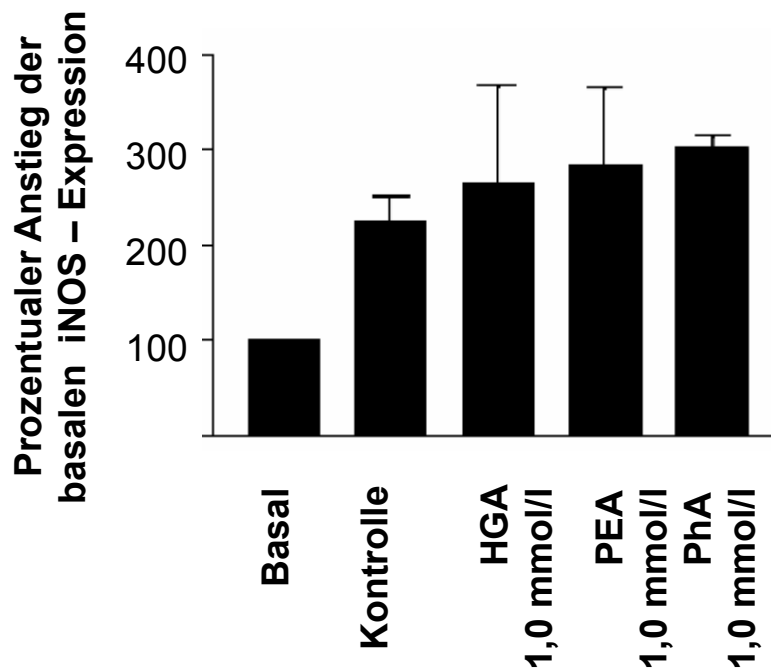


Abbildung 8:

Einfluss von Phenylalaninderivaten auf die iNOS - Expression. Basal = iNOS - Expression unstimuliert. Kontrolle = iNOS - Expression nach Stimulation mit IFN γ 100 u/ml und LPS 1 μ g/ml über 6 h. HGA = Homogentisinsäure, PEA = Phenylethylamin, PhA = Phenylalanin. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (n=6).

3.5. Stimulation der iNOS - Expression in RAW 264.7 durch LPS sowie Hemmung durch PAA

Nach 6stündiger Stimulation von Makrophagen der murinen Zelllinie RAW 264.7 mit LPS 1µg/ml kam es vergleichbar zu den Beobachtungen bei humanen Monozyten zu einer signifikanten Zunahme der iNOS - Expression. Nach Zugabe von PAA zu dem Kulturmedium kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der iNOS - Expression (Abbildung 9).

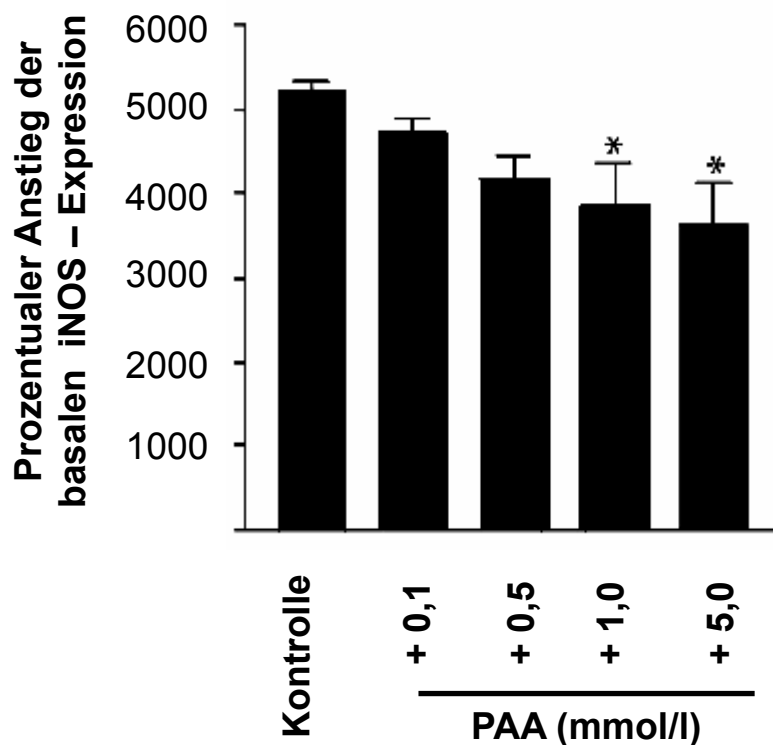


Abbildung 9:

Inhibierung der iNOS - Expression durch unterschiedliche PAA - Konzentrationen in mit 1 µg/ml LPS über 6 h stimulierten RAW 264.7 - Zellen, gemessen mit real- time PCR. Als Kontrolle dient die iNOS - Expression nach Simulation mit LPS 1 µg/ml. Die basale, unstimulierte iNOS - Expression wurde als 100% gesetzt. (n=6, dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM). * p< 0,05, verglichen mit iNOS - Expression nach Stimulation)

3.6. Bestimmung der Zellviabilität

Durch Färbung mit Trypanblau und Auszählen der gefärbten Zellen in einer Zählkammer wurde der Anteil der lebenden und toten Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt. Dabei ergab sich, dass die Zugabe von PAA zum Kulturmedium in den verwandten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Vitalität von RAW 264.7 Zellen hatte (Abbildung 10).

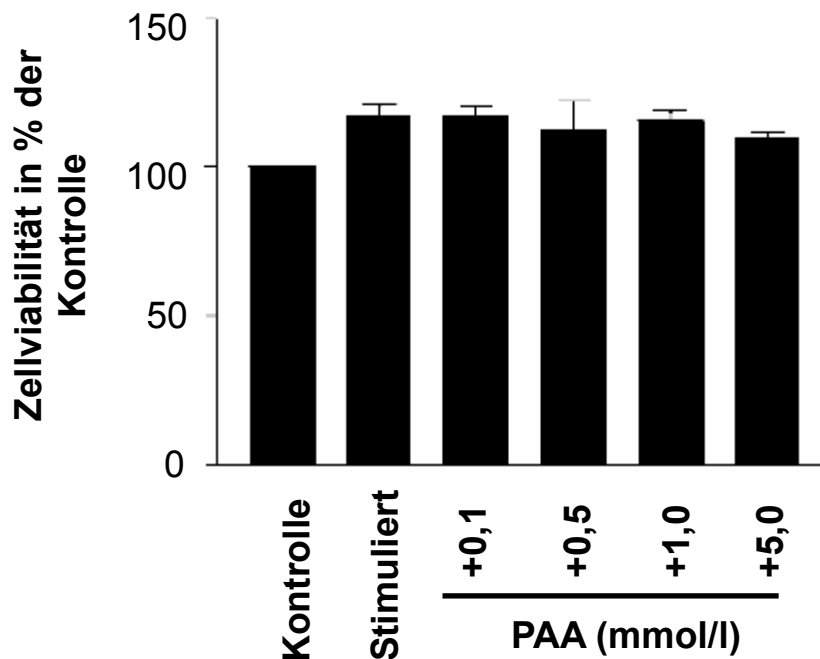


Abbildung 10: Vitalität von RAW 264.7 - Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von PAA nach Stimulation mit LPS 1µg/ml über 12 Stunden, verglichen mit der Vitalität von stimulierten Zellen ohne Zusatz von PAA (Stimuliert) und unstimulierten Zellen (Kontrolle). (n=6, dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM).

3.7. Western - Blot nach Stimulation von RAW 264.7 - Zellen unter dem Einfluss von PAA

Nachdem eine Abnahme der iNOS - mRNA - Expression durch den Einfluss von PAA

mittels real - time PCR nachgewiesen werden konnte stellte sich die Frage, ob dieser Effekt sich auch auf Proteinebene nachweisen lässt und eine funktionelle Relevanz hat. Da das iNOS - Gen in humanen Monozyten einer ausgeprägten posttranslationalen Regulation unterliegt (Kone et al., 2003) und demzufolge die Proteinmenge nicht ausreichend wäre, wurden diese Versuche mit murinen Makrophagen durchgeführt. Nach Stimulation mit LPS 1 µg/ml über 12 h ließ sich eine Zunahme der Menge an iNOS - Protein mittels Westernblot nachweisen (Abbildung 11 und 12).

Unter dem Einfluss von PAA kam es ab Konzentrationen von 1mmol/l zu einer signifikanten Abnahme der iNOS - Proteinmenge. Um die gewonnenen Daten zu quantifizieren, wurde ein Imageanalyzer verwendet, der die densitometrischen Unterschiede erfasste. Anschließend wurden die erhaltenen Werte zu den Messwerten von β - Actin ins Verhältnis gesetzt.

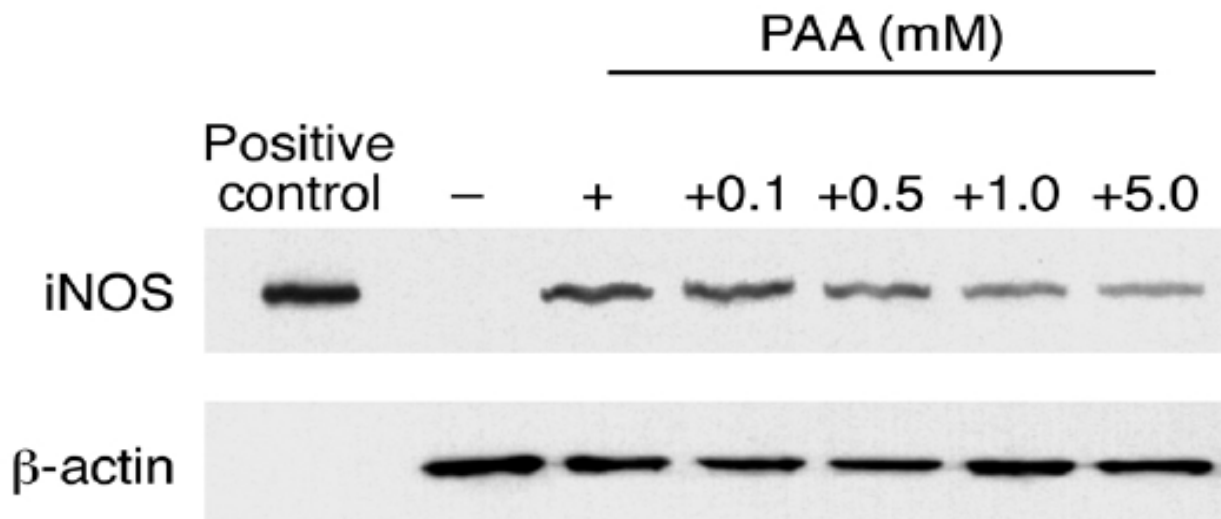


Abbildung 11: Repräsentativer Immunoblot von iNOS und β - Actin nach 12 Stunden ohne Stimulation (-), nach 12 Stunden Stimulation mit IFN γ 100 u/ml und LPS 1µg/ml (+) sowie nach Zugabe von PAA in unterschiedlichen Konzentrationen zu stimulierten RAW 264.7 - Zellen. Das iNOS - Protein wurde als eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 125 kDa detektiert.

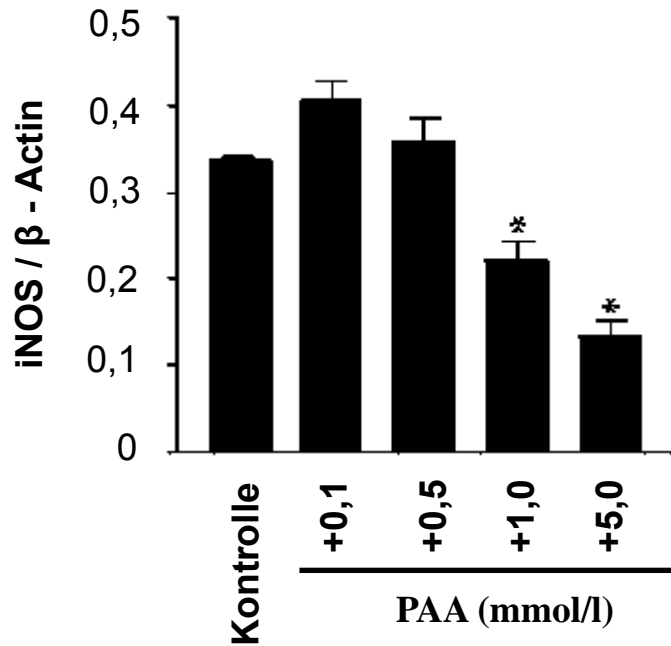


Abbildung 12: Ergebnisse der densitometrischen Messung der iNOS – Westernblots nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von PAA zum Kulturmedium von mit 1 μ g/ml LPS über 12 Stunden stimulierten RAW 264.7 - Zellen. Die iNOS – Signale wurden mit einem Image – Analyser quantifiziert und zu den Signalen von β – Actin normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachmessungen. Kontrolle = Stimulation mit LPS 1 μ g/ml über 12 h. (n = 3) * p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

3.7. Messung der Nitritbildung mittels Griess – Assay

Mittels Griess - Reaktion wurde die Nitritmenge im Kulturmedium nach Stimulation und unter dem Einfluss unterschiedlicher PAA - Konzentrationen gemessen. Die Nitritmenge kann als indirekter Nachweis der iNOS - Aktivität angesehen werden, da das gebildete NO mit O₂ im Kulturmedium zu Nitrit reagiert. Durch Vergleich mit einer Standardkurve, die durch die Messung von Lösungen mit bekannter Nitritkonzentration erstellt wurde, ließ sich die Nitritproduktion quantifizieren (Abbildung 13).

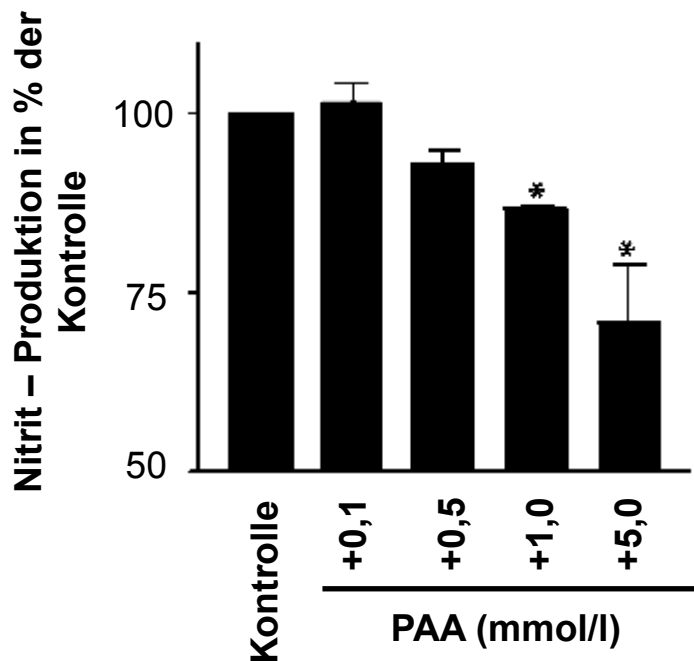


Abbildung 13: Mittels Griess - Assay gemessene Nitritmenge im Kulturmedium von RAW 264.7 - Zellen nach Stimulation mit LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ über 6h (Kontrolle) und unter dem Einfluss verschiedener PAA - Konzentrationen (n=6, Mittelwerte +/- SEM, * p < 0,05).

3.8. Einfluss von PAA auf die endotheliale NOS - Isoform

Die endotheliale NO - Synthese in ECV 304 - Zellen wurde durch Zugabe von Acetylcholin 1 $\mu\text{mol/l}$ zum Kulturmedium stimuliert. Anhand der mit dem Griess - Assay ermittelten Nitritmenge im Kulturmedium wurde der Einfluss unterschiedlicher PAA - Konzentrationen sowie des eNOS - Inhibitors L - NAME (NG - nitro - L - Argininmethylester) analysiert. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, wurde die NO - Produktion durch eNOS vom Vorhandensein von PAA nicht beeinflusst, wohl aber durch die Gegenwart des eNOS - Inhibitors L - NAME.

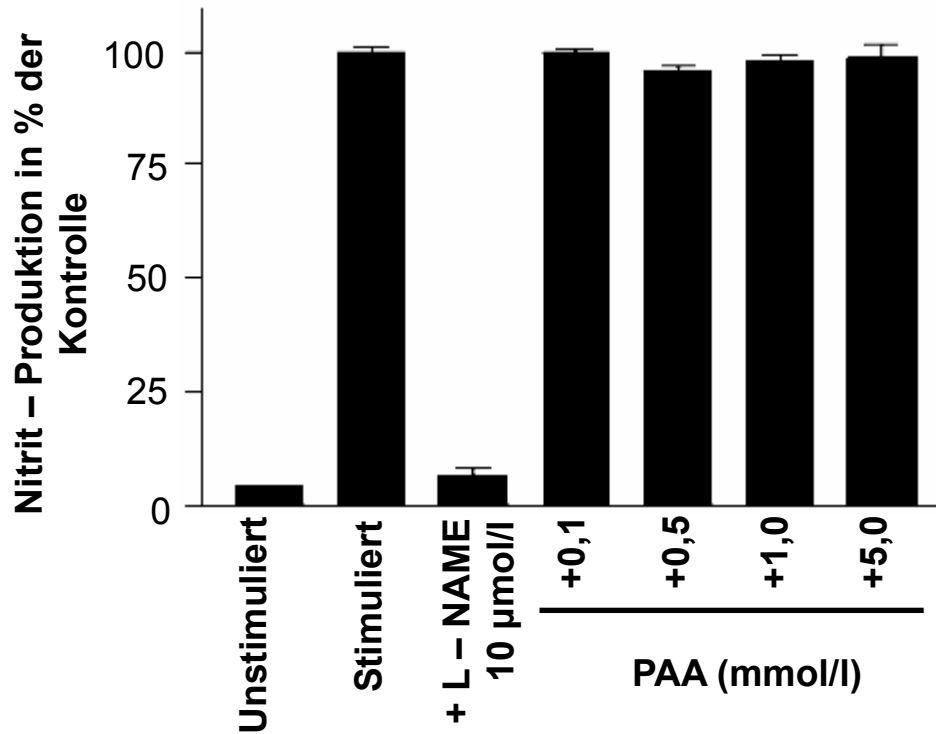


Abbildung 14:

Einfluss verschiedener PAA – Konzentrationen und des eNOS – Inhibitors L – NAME auf die Nitritproduktion mit 1 µmol/l Acetylcholin stimulierter ECV 304 - Zellen. Die Nitrit – Produktion durch eNOS wurde mit dem Griess - Assay gemessen. Unstimuliert= Nitritproduktion nach 30 Minuten Kultur ohne Zugabe von Acetylcholin. Stimuliert = Nitritproduktion nach Zugabe von Acetylcholin 1 µmol/l zum Kulturmedium über 30 Minuten. Als Kontrolle diente die Nitritproduktion unstimulierter Zellen (n= 6; dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM).

L – NAME = NG – nitro – L – Argininmethylester.