

Aus dem Institut der Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekt des Urämietoxin Phenylacetessigsäure  
(PAA) auf die Expression der induzierbaren NO-  
Synthase**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Tibor Krauser

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
2. Prof. Dr. med. R. Schindler  
3. Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Datum der Promotion: 21.11.2008

## Inhaltsverzeichnis

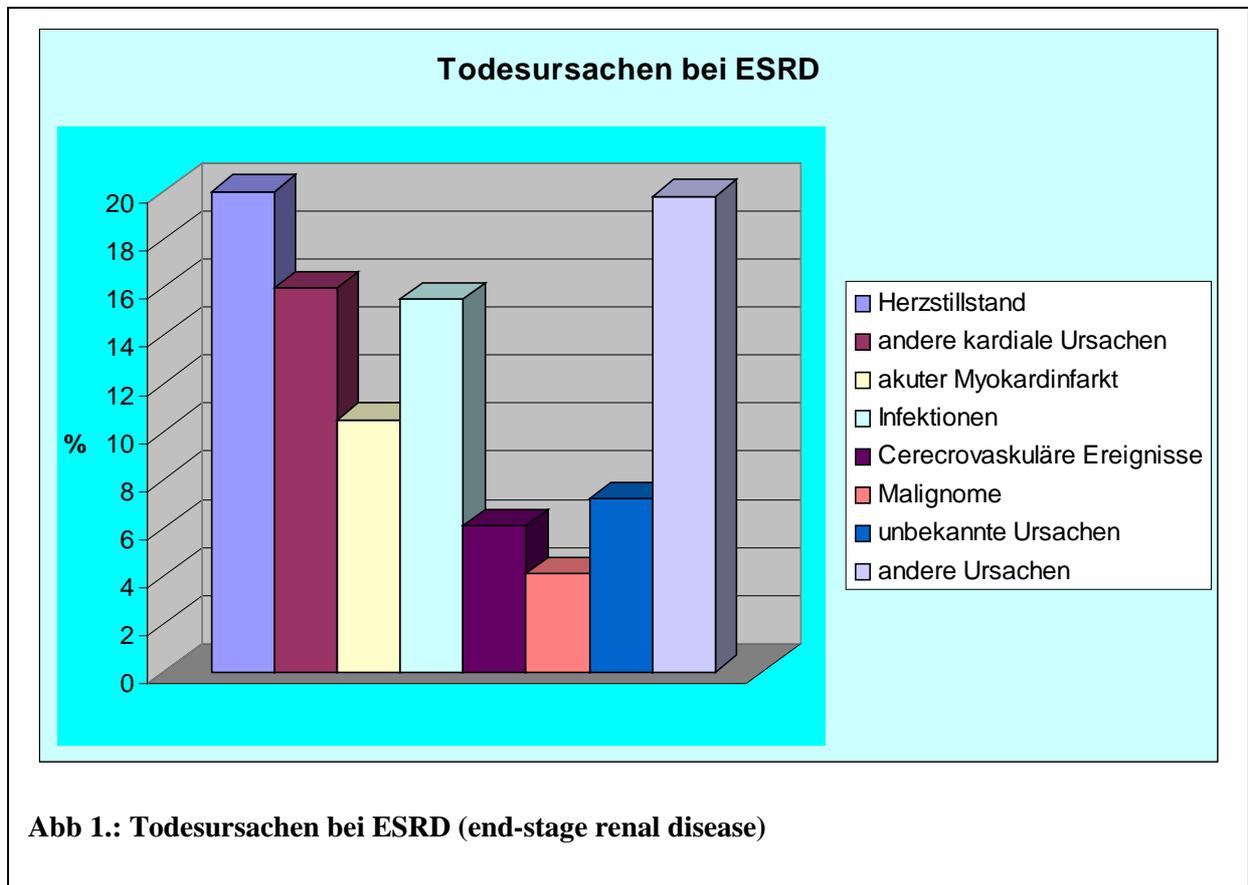
<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>5</b>
1.1	<b><u>Hintergrund: Erhöhte Inzidenz von Entzündungen bei Patienten mit chronischer Hämodialyse</u></b>	<b>5</b>
1.2	<b><u>Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz</u></b>	<b>7</b>
1.3	<b><u>Methode der Dialyse</u></b>	<b>9</b>
1.4	<b><u>Die Rolle der Urämietoxine</u></b>	<b>10</b>
1.5	<b><u>Phenylacetessigsäure als Urämietoxin</u></b>	<b>11</b>
1.6	<b><u>Das unspezifische Immunsystem</u></b>	<b>12</b>
1.7	<b><u>Molekulare Abwehrmechanismen in Makrophagen</u></b>	<b>13</b>
1.8	<b><u>Die Regulation der iNOS in Phagocyten</u></b>	<b>17</b>
1.9	<b><u>Fragestellung</u></b>	<b>19</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>20</b>
2.1	<b><u>Zellkultur</u></b>	<b>20</b>
2.1.1	<u>Materialien:</u>	20
2.1.2	<u>Makrophagen der Zellreihe RAW 264.7</u>	20
2.2	<b><u>TaqMan</u></b>	<b>21</b>
2.2.1	<u>Das Grundprinzip der Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)</u>	21
2.2.2	<u>Bestimmung der Halbwertszeit von iNOS mRNA</u>	26
2.3	<b><u>Westernblott</u></b>	<b>27</b>
2.3.1	<u>Reagentien und Materialien</u>	27
2.3.2	<u>Isolierung von Gesamtprotein</u>	27
2.3.3	<u>Isolierung von nukleären Protein</u>	28
2.3.4	<u>Isolierung von Phosphoprotein</u>	28
2.3.5	<u>Durchführung des Westernblottes</u>	29
2.4	<b><u>NFkB – Assay</u></b>	<b>30</b>
2.5	<b><u>Detektion von Stickstoffmonoxid (NO)</u></b>	<b>31</b>
2.6	<b><u>Bioplex</u></b>	<b>33</b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>36</b>
3.1	<b><u>Feststellung der Zeitpunkte der maximalen Expressionen</u></b>	<b>36</b>
3.1.1	<u>Zeitpunkt der maximalen NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Stimulation</u>	36
3.1.2	<u>Zeitpunkt der maximalen iNOS mRNA Stimulation</u>	37
3.1.3	<u>Zeitpunkt der maximalen Protein Stimulation</u>	38
3.2	<b><u>PAA inhibiert die Cytokininduzierte iNOS Expression in RAW 264.7 Makrophagen</u></b>	<b>39</b>

3.2.1	<u>iNOS mRNA Expression unter der Einwirkung von PAA</u> .....	39
3.2.2	<u>iNOS – Protein Expression unter der Einwirkung von PAA</u> .....	41
3.2.3	<u>Nitrit – Expression unter Einwirkung von PAA</u> .....	42
3.2.4	<u>iNOS mRNA Degradation unter PAA</u> .....	43
<b>3.3</b>	<b><u>Darstellung der Signaltransduktion von PAA</u></b> .....	<b>45</b>
3.3.1	<u>Zeitpunkt der maximalen Aktivierung von NFκB</u> .....	45
3.3.2	<u>Effekt von PAA auf die Expression von NFκB</u> .....	46
3.3.3	<u>Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung der MAP - Kinasen</u> .....	48
3.3.4	<u>Einfluss von PAA auf die Phosphorylierung der MAP – Kinasen</u> .....	49
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b> .....	<b>51</b>
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b> .....	<b>60</b>
<b>8</b>	<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b> .....	<b>62</b>
<b>9</b>	<b><u>Curriculum vitae</u></b> .....	<b>64</b>
<b>10</b>	<b><u>Danksagung</u></b> .....	<b>65</b>
<b>11.</b>	<b><u>Erklärung</u></b> .....	<b>66</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund: Erhöhte Inzidenz von Entzündungen bei Patienten mit chronischer Hämodialyse

Patienten, die an einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz leiden, haben gegenüber der Normalbevölkerung eine erhöhte Mortalität. Ursächlich werden hierzu in der Literatur an erster Stelle die Artherosklerose mit den einhergehenden Begleiterkrankungen, wie koronare Herzerkrankung (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und



cerebrovaskuläre Erkrankungen beschrieben [Cheung AK et al.; 2000]. Ferner besitzt die Inzidenz und Mortalität durch Entzündungen und Immunsuppression eine fast ebenso hohe Bedeutung.

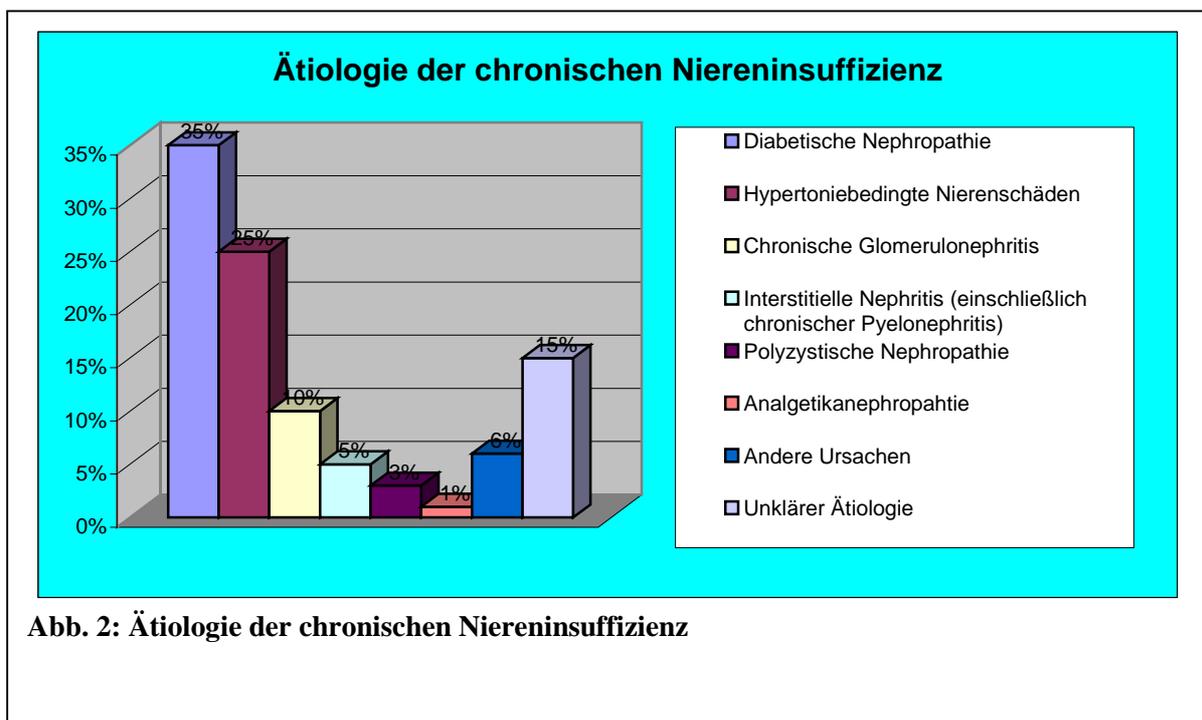
Die „European Uremic Toxin (EuTox) Work Group“ hat in der letzten Zeit ungefähr 90 verschiedene Substanzen identifiziert und diese als Dialysegifte bzw. Urämietoxine deklariert und in einer Liste zusammengefasst. Es handelt sich bei diesen Substanzen um physiologisch entstehende Stoffwechselprodukte, welche von einer gesunden Niere ausgeschieden werden können und somit eigentlich keine pathologische Bedeutung haben. Patienten jedoch, die an einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz leiden, zeigen eine erhöhte Konzentration dieser Gifte. Auch durch eine Dialysetherapie können Urämietoxine nicht, oder nur in sehr geringem Umfang eliminiert werden. In dieser Arbeit wird besonderer Wert auf die Untersuchung des Dialysegiftes Phenylacetessigsäure (PAA) gelegt.

Phenylacetessigsäure ist im Blut gesunder Menschen nur in einer sehr geringen Menge nachweisbar. Im Plasma chronischer Dialysepatienten jedoch (end – stage renal failure) werden dagegen Plasmakonzentrationen von  $3.49 \pm 0,33$  mmol/l gemessen. [*J. Jankowski, et al.; 2003*]

Zentraler Punkt dieser Arbeit soll es deswegen sein, die Frage zu beantworten, welche Auswirkung PAA auf die Expression der induzierbaren NO – Synthase hat und ob sich damit gegebenenfalls Effekte und Ursachen einer erhöhten Inzidenz von Entzündungen erklären lassen.

## 1.2 Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz

Die Niereninsuffizienz wird in vier Stadien eingeteilt. Im ersten Stadium der Niereninsuffizienz, dem kompensierten Dauerstadium, besteht nur eine leichte Einschränkung der Kreatininclearance und der Konzentrationsfähigkeit, bei noch normalen Retentionswerten. Das folgende Stadium wird als Stadium der kompensierten Retention bezeichnet. Dies bedeutet, dass es zu einer Kreatininerhöhung bis 6 mg/dl (530  $\mu$ mol/l) kommt, jedoch klinische Urämiesymptomen aber noch nicht erkennbar sind. In den kritischen Stadien III (präterminale Niereninsuffizienz) und Stadium IV (terminale Niereninsuffizienz) steigen die



Kreatininwerte auf über 8 mg/dl (707  $\mu$ mol/l), bzw. über 10 mg/dl (884  $\mu$ mol/l) an. [Harrisons Innere Medizin; 2005]. Es treten in diesen Phasen trotz Ausschöpfung konservativer Möglichkeiten urämische Symptome auf. Dies sind insbesondere ein Gewichtsanstieg und das Auftreten von Ödemen durch eine vermehrte Natrium- und Wasserretention, Herzinsuffizienz, urämische Gastroenteritis mit Erbrechen und Durchfällen, urämische Neuropathie, Lungenödem („fluid lung“), Blutungsneigung und schließlich Koma und Tod. [USRDS – Report 1997] Das Stadium IV der Niereninsuffizienz macht eine Nierenersatztherapie erforderlich.

In den letzten Jahren wurde die bestehende Einteilung durch ein zusätzliches fünftes Stadium ergänzt (s. Abbildung 3). Dieses wird definiert als chronisches Nierenversagen mit einer Filtrationsrate unter 15 ml/min. In den vorhergehenden Stadien 3 und 4 ist nur noch die GFR zur Klassifizierung entscheidend. Die Stadien 1 und 2 werden gegliedert nach der GFR, dem Auftreten einer Proteinurie oder morphologischen Veränderungen.

Stadium	GFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	Proteinurie nachweisbar	Keine Proteinurie nachweisbar
1	>89	Nierenkrankheit mit normaler Nierenfunktion	Normalbefund
2	60 - 89	Nierenkrankheit mit milder Nierenfunktionseinschränkung	milde Nierenfunktionseinschränkung, aber <b>keine</b> Nierenkrankheit
3	30 - 59	Nierenerkrankungen mit einer moderaten Nierenfunktionseinschränkung	
4	15 - 29	Nierenerkrankungen mit einer schweren Nierenfunktionseinschränkung	
5	<15	Chronisches Nierenversagen	

(Quelle: NKF; KDOQI - Guidelines)

**Abb. 3: Stadieneinteilung des chronischen Nierenversagen (National Kidney Foundation; Feb. 2002)**

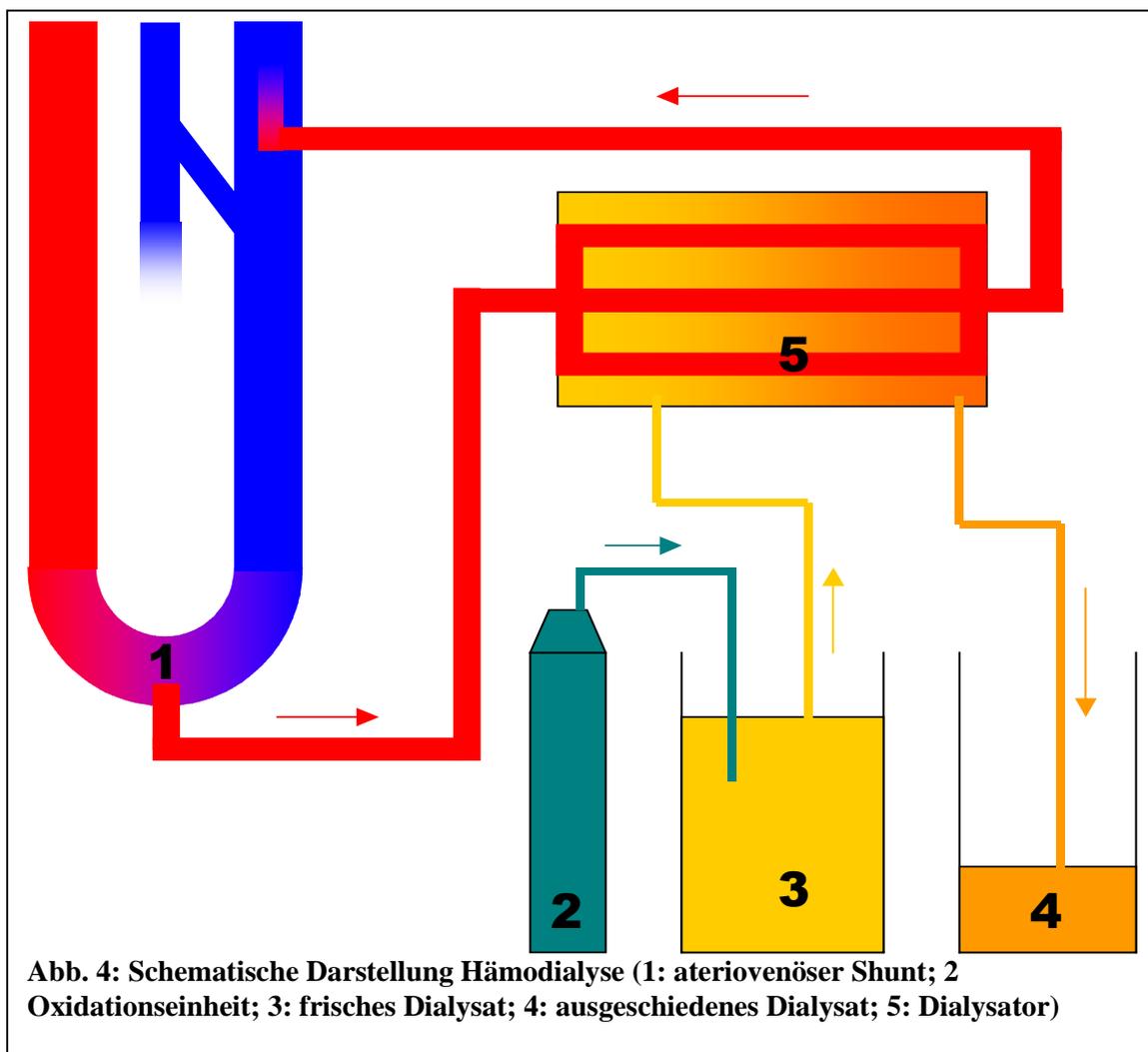
Zusammenfassend ist die terminale Niereninsuffizienz also Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren. Als Ursachen werden an erster Stelle die diabetische Nephropathie (35%), folgend von den hypertoniebedingten Nierenschäden (ca. 25%) und der chronischen Glomerulonephritis (ca. 10%) angegeben. Als weitere Gründe werden die Interstitielle Nephritis (ca. 5% - einschließlich der chronischen Pyelonephritis), die polyzystische Nephropathie (ca. 3%) und neben anderen Ursachen (Kollagenosen, Vaskulitiden, Amyloidosen) die Analgetikanephropathie (ca. 1%) angegeben. Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Ätiologie der chronischen Niereninsuffizienz. Die chronische Niereninsuffizienz hat zur Folge, dass es zu einem Versagen, der exkretorischen Nierenfunktion kommt. Damit gehen Störungen im Wasser-, Elektrolyt-, und Säure – Basen – Haushalt einher. Außerdem kommt es zu einer Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion, was eine verminderte Sekretion von

Erythropoetin, Renin, Calcitriol und Prostaglandinen zur Folge hat. Zusätzlich führt die Retention von harnpflichtigen Substanzen zu toxischen Organschäden. Nach Ausschöpfen konservativer Therapiemöglichkeiten, steht im Stadium IV der chronischen Niereninsuffizienz die Nierenersatztherapie, die Dialyse, zur Verfügung.

### 1.3 Methode der Dialyse

Die Dialysebehandlung ermöglicht es heutzutage den Patienten im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz, beruflich und sozial rehabilitiert, ihr Leben weiterzuführen.

Die Methode der Dialyse beruht auf einem einfachen physikalischen Prinzip: Nach dem Fick'schen Gesetz diffundieren über eine semipermeable Membran die harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut in das isotonische und isoionische Dialysat. Durch eine große



Dialysatmenge wird das Konzentrationsgefälle zwischen Blut und dem Dialysat aufrechterhalten. Als Membranen werden sowohl synthetische Materialien (extrakorporale Hämodialyse), als auch das Peritoneum (Peritonealdialyse) benutzt. Durch einen osmotischen oder physikalischen Druckgradienten über die Membran kann dem Blut Wasser entzogen werden (Ultrafiltration). Als weiteres physikalisches Gesetz kommt die Konvektion zum Tragen. Durch sie wird bei der Hämofiltration dem Blut Plasmawasser entzogen, das bis zu einem Molekulargewicht von ca. 30.000 Dalton alle im Plasma gelösten Substanzen in gleicher Weise enthält.

Vor Beginn der Dialysebehandlung wird bevorzugt am Unterarm eine arteriovenöse Fistel angelegt. Die durch den vermehrten Druck dilatierte Vene lässt sich so leichter punktieren. Für die Peritonealdialyse werden analog dazu Katheter in die Bauchhöhle eingelegt.

Eine Dialysebehandlung erfolgt dreimal pro Woche, wobei sich abhängig von Körpergröße und restlicher Nierenfunktion eine Gesamtbehandlungsdauer von ca. 12 – 18 Stunden pro Woche ergibt.

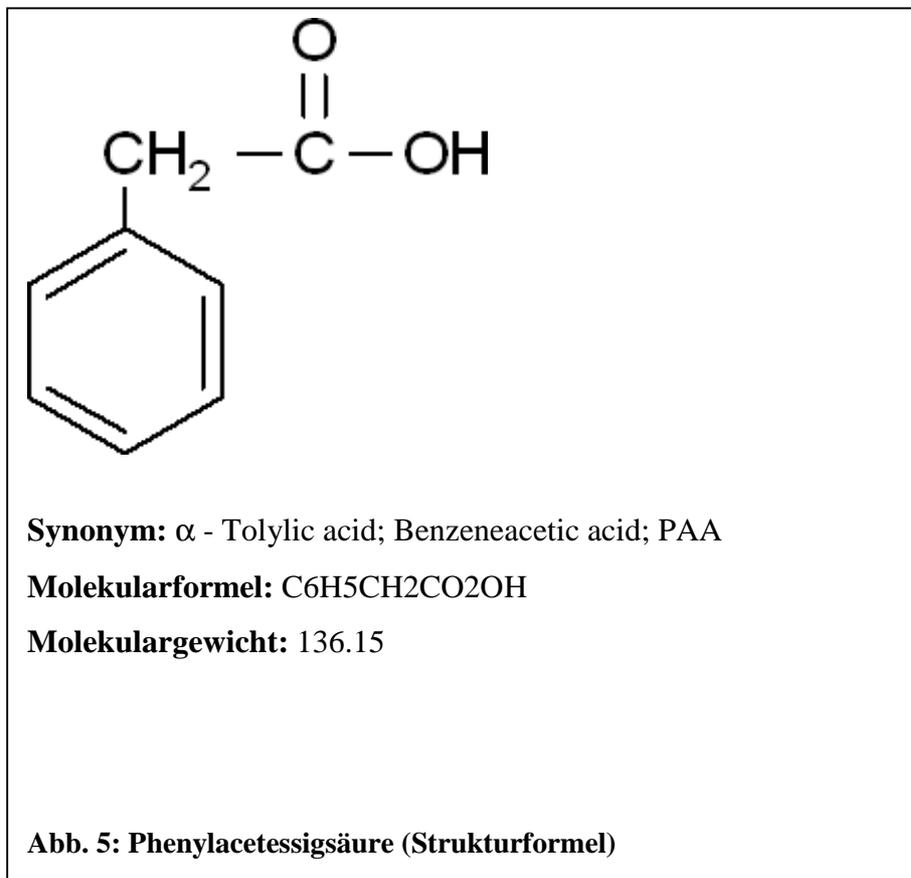
#### ***1.4 Die Rolle der Urämietoxine***

In einem Kompendium aus dem Jahre 2003 wurde aus den bestehenden gewonnenen Daten eine zusammenfassende Liste über bekannte Urämietoxine sowie ihre normale und maximale Konzentration vorgenommen [Raymond Vanholder R.; 2003]. Mittlerweile sind über 90 Urämiegifte bekannt, die sich in unterschiedliche Stoffgruppen einteilen lassen.

Das urämische Syndrom steht für eine Retention eben dieser erwähnten Urämiegifte, welche normalerweise durch eine gesunde Niere ausgeschieden werden können. So ist es erklärlich, dass sich bei Störung der physiologischen Ausscheidungswege (renal) eine Zunahme der Plasmakonzentration ergibt. Abhängig ist diese Konzentration unter anderem von der Löslichkeit, dem Molekulargewicht und der Plasmaproteinbindung.

### 1.5 Phenylacetessigsäure als Urämietoxin

Phenylacetessigsäure ist ein Abbauprodukt der Aminosäure Phenylalanin. Phenylalanin wird primär durch das Enzym der Phenylalaninhydroxylase zu Tyrosin metabolisiert. Eine verminderte Aktivität der Phenylalaninhydroxylase führt zu der häufigsten genetischen Störung im Aminosäurestoffwechsel, der Phenylketonurie. Neben diesem bekannten Weg wird Phenylalanin auch durch Decarboxylierung zu Phenylethylamin verstoffwechselt. Aus diesem Zwischenprodukt entsteht zu 90% Phenylacetessigsäure durch Oxidation und zu 10 % Mandelsäure.



Phenylacetessigsäure ist im Blut gesunder Menschen nur in einer sehr geringer Menge nachweisbar. Im Plasma von Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz jedoch (end – stage renal failure) wurden dagegen Plasmakonzentrationen von  $3,49 \pm 0,33$  mmol/l gemessen.

Eine Arbeitsgruppe [Jankowski et. al.; 2003] konnte zeigen, dass eine erhöhte Plasmakonzentration von Phenylacetessigsäure im Blut von Patienten mit einer terminalen

Niereninsuffizienz zu einer Hemmung der induzierbaren NO – Synthase (iNOS) führt. Über die Rolle der iNOS soll im anschließenden Abschnitt meiner Arbeit ausführlicher eingegangen werden.

### ***1.6 Das unspezifische Immunsystem***

Die einfachste Form der Immunantwort ist die angeborene oder die unspezifische frühe Immunantwort, die den Organismus für 4 – 5 Tage schützt. Dieses System ist zwar nicht in der Lage einen Krankheitserreger vollständig zu vernichten, hemmt aber dessen weitere Ausbreitung, solange bis das adaptive – spezifische - Immunsystem aktiviert ist.

Im Zentrum der unspezifischen Immunantwort steht auf der einen Seite das Komplementsystem, dessen Aktivierung über den klassischen und alternativen Weg zu einer Bakteriolyse führt, auf der anderen Seite steht die Immunabwehr durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten.

Die neutrophilen Granulozyten, auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet, phagozytieren stark und sind reich an in Granula verpackten Hydrolasen (Proteasen, Elastasen, Kollagenasen, Lysozym und Kathepsin G). Mit Hilfe dieser Enzyme können sie Bakterien auflösen. Durch die Freisetzung chemotaktischer Stoffe (Komplementfaktor C5a, Leukotrien B<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , Interleukin – 1) während der Frühphase einer Entzündung sind neutrophile Granulozyten imstande, die Blutbahn zu verlassen und durch amöboide Bewegung den Entzündungsort erreichen. Nach Kontakt mit dem Fremdkörper wird dieser von Cytoplasmaausläufern (Pseudopodien) des Granulozyten umschlossen und in den Zelleib aufgenommen. Durch die Fusion der Pseudopodien an der distalen Seite des Mikroorganismus entsteht eine von der Zellmembran umschlossene Phagozytenvakuole (Phagosom), in die das Bakterium eingekapselt wird. Nach Aufnahme des Fremdkörpers verschmelzen die Granula des Granulozyten mit dem Phagosom, wobei die Enzyme in die Vakuole einfließen, ohne in das Cytosol der Zelle zu gelangen. Der neutrophile Granulozyt stirbt mit dem abgetöteten Bakterium ab, da die Wand der mit den Enzymen angefüllte nicht aus der Zelle entfernt werden kann, und nach einigen Stunden durchlässig wird. Es ergießt sich deren Inhalt in die Zelle und zerstört sie auf diese Weise.

Aus Monocyten differenzieren sich Gewebsmakrophagen. Diese enthalten ebenso wie die neutrophilen Granulozyten cytosolische Granula, in denen sich ebenfalls lysosomale Enzyme befinden. Durch ihre Fähigkeit zur Erkennung, Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Antigenen nehmen Makrophagen eine Schlüsselfunktion im Immunsystem ein. Im

Rahmen der Phagozytose wird das Antigen internalisiert und durch proteolytische Enzyme zu Antigenfragmenten abgebaut. Einzelne Fragmente werden zusammen mit MHC-II-Proteinen in die Plasmamembran verlagert. Dieser, als Antigenpräsentation bezeichnete Vorgang, führt durch einen direkten Zellkontakt mit T – Lymphozyten zur Freisetzung verschiedener Zytokine: Interleukin 1 (Makrophage), Interleukin 2 (T-Lymphozyt),  $\gamma$ - Interferon (T-Lymphozyt), TNF- $\alpha$  (Makrophage).

Diese koordinierte Reaktion des Organismus auf bakterielle Infektionen wird als Akut – Phase – Reaktion bezeichnet.

### ***1.7 Molekulare Abwehrmechanismen in Makrophagen***

Stickstoffmonoxid (NO) ist das Produkt der NO – Synthase (NOS). Es existieren im menschlichen Körper drei verschiedenen Isoformen dieses Enzyms: Zum einen gibt es eine neuronale NOS, eine endotheliale NOS, sowie iNOS- induzierbare NO - Synthase.

NO spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen zentralen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel bei der Regulation des Muskeltonus der Gefäße und der Thrombinregulation. Ebenso wird durch NO in entscheidender Weise auch die Abwehr, um genauer zu sein, die Phagozytenaktivität beeinflusst. Ausgehend von dem Punkt, dass im menschlichen Körper drei verschiedene Isoenzyme für die NO- Produktion existieren (Constitutive,- endotheliale,- inducible NO – Synthase), spielt besonders die iNOS für die Abwehr von Bakterien eine zentrale Rolle. In vitro konnte gezeigt werden, dass die entscheidenden Triggermechanismen für die Aktivierung der iNOS im intestinalen Epithel Cytokine wie Interferon -  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sind.

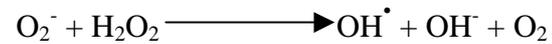
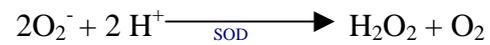
Die Abtötung intrazellulärer Bakterien kommt durch zwei ineinandergreifende Systeme zustande: Reactiv oxygen species (ROS) und Reactive nitrogen species (RNS).

Zentrales Enzym der „Reactiv oxygen species“ (ROS) ist die NADPH – Oxidase, welche in Phagozyten Phagozytenoxidase (Phox) genannt wird. Durch dieses Enzym ist es möglich, eine Reduktion des molekularen  $O_2$  zu  $O_2^-$  über die folgende Reaktion herbeizuführen:

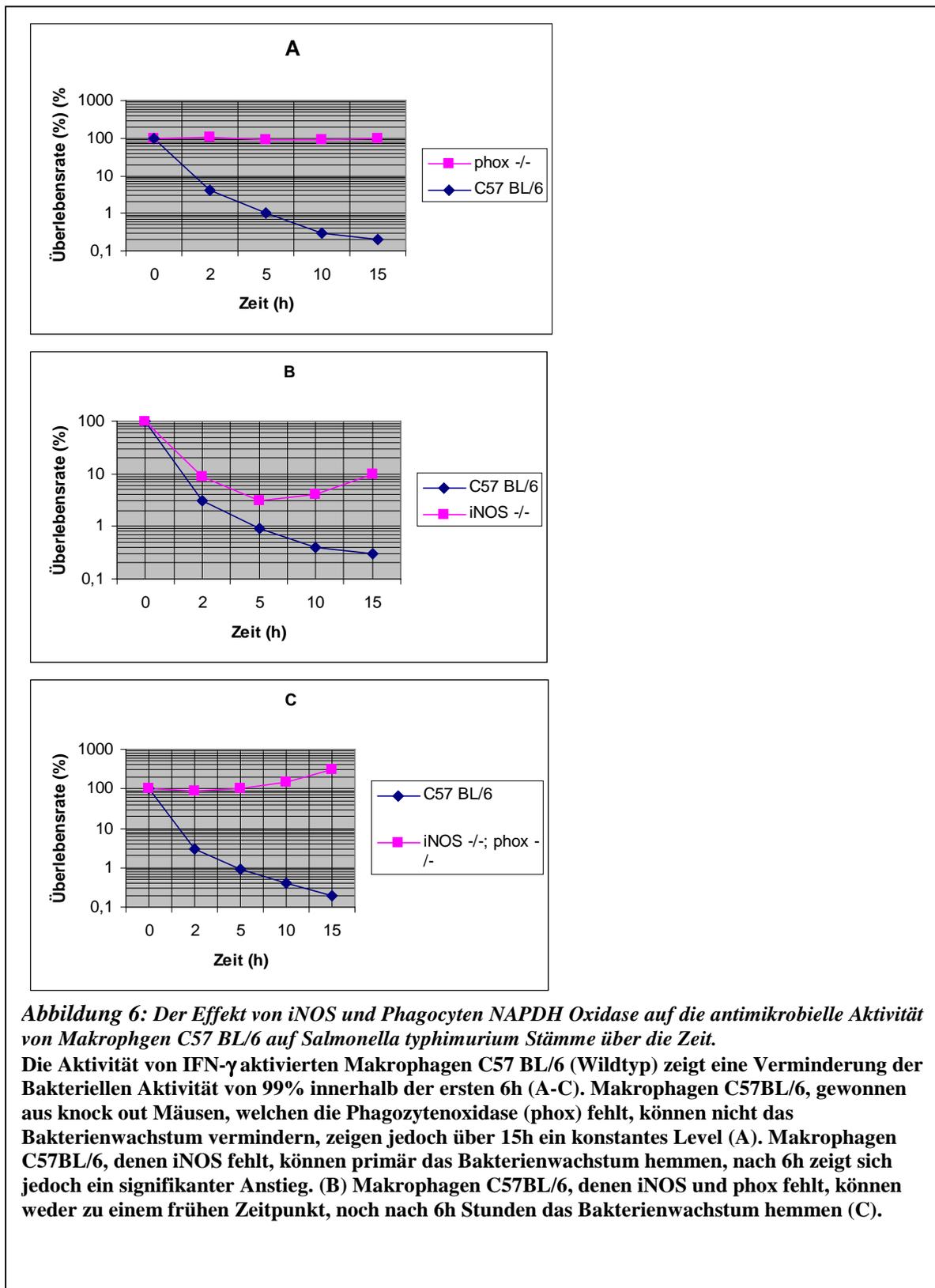


Dieses Superoxidanion ( $O_2^-$ ) hat nur eingeschränkte Membrangängigkeit und moderate Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung von Bakterien. Es ist allerdings Precursor von weiteren ROS. So kann durch die Superoxiddismutase (SOD) eine Reduktion zu Wasserstoffperoxid

erfolgen, oder es kann mit bereits gebildetem Wasserstoffperoxid unter Bildung hochaktiver Hydroxylradikale reagieren.



Die Bedeutung der Phox wird deutlich bei Immundefekten für eben dieses Enzym im Sinne eines „chronic granulomatous disease“, wodurch ein erheblich vermindertes Abwehrpotential insbesondere für bakterielle Infektionen, wie zum Beispiel durch *Salmonella typhimurium* besteht.



Auf der anderen Seite ist das zentrale Enzym des RNS die iNOS. Sie ist verantwortlich für die intrazelluläre Synthese von NO. Dafür wird molekularer Sauerstoff und L – Arginin benötigt. Auch NO besitzt keine große antibakterielle Potenz, kann aber durch Autooxidation in aktiviertere Zustände, wie zum Beispiel  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{N}_2\text{O}_3$ , übergehen.

Des weiteren kommt es zu einem Zusammenwirken von ROS und RNS in der Reaktion von NO und  $O_2^-$  zu Peroxinitrit ( $ONOO^-$ ), welches eine starke antimikrobielle Wirkung besitzt und in der Lage ist, Fette, Proteine und DNA mit hoher Potenz zu zerstören.

Zeitlich gesehen laufen die beiden Systeme (ROS und RNS) nacheinander ab: ROS führt zu einer initialen Verminderung von intrazellulären Bakterien. RNS ist dagegen für bakterio-statische Wirkung verantwortlich. Durch das primär einsetzende ROS, kommt es zu einem raschen, nicht mitochondrialen Sauerstoffverbrauch innerhalb des Granulozyten auf das hundertfache, dem sog. „respiratory burst“. Im Gegensatz dazu kann RNS eine langfristige bakterio-statische Wirkung entfalten.

In einer Arbeit [Andrès Vazquez – Torres et.al.;2008] wurde die antimikrobielle Wirkung von iNOS und NADPH untersucht. Hierbei wurden Makrophagen künstlich mit *Salmonella typhimurium* infiziert. Die Makrophagen wurden aus verschiedenen knock out Mäusen gewonnen, iNOS<sup>-/-</sup>, gp91phox<sup>-/-</sup>, sowie doppelt immundefizient iNOS<sup>-/-</sup> gp91phox<sup>-/-</sup>. Die Infektion von vollkompetenten Makrophagen (iNOS<sup>+/+</sup> gp91phox<sup>+/+</sup>) führte über den beobachteten Zeitraum von 15 h zu einer Reduktion von 99% der intrazellulären Bakterien. Bei den iNOS<sup>-/-</sup> Makrophagen kam es innerhalb der ersten 6 Stunden zu einer Reduktion der intrazellulären Infektion. Danach aber kam es zu einem erneuten Anstieg (Vermehrung) der Bakterien. Es scheint also, dass iNOS eine bakterio-statische Wirkung auf intrazelluläre Bakterien hat. In den iNOS<sup>-/-</sup> gp91phox<sup>-/-</sup> Makrophagen kam es ohne Reduktion zu einem stetigen Anstieg der intrazellulären Keimzahlen. (s. Abb.: 6)

### 1.8 Die Regulation der iNOS in Phagozyten

NO ist ein Produkt der NO-Synthase (NOS). Im menschlichen Körper existieren drei verschiedene Isoenzyme, die neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und iNOS. Für die Aktivierung der iNOS gibt es zwei große Hauptkaskaden:

Zunächst aktivieren verschiedene Stimuli an der Zellmembran die NF $\kappa$ B-Kaskade. NF $\kappa$ B besteht aus zwei Untereinheiten p65/p50, und ist im Ruhezustand an inhibitorisches- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) gebunden. Äußere Reize führen zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B, was zur Abspaltung des Inhibitor-Komplexes führt. Anschließend kommt es zur Translokation von p65/p50 in den Zellkern. Durch die Bindung an die entsprechende Promoterregion kann so die iNOS-Transkription aktiviert werden. (s. Abbildung 7)

Des Weiteren basiert die Aktivierung von iNOS auf der Phosphorylierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). Hierbei handelt es sich um eine Familie von

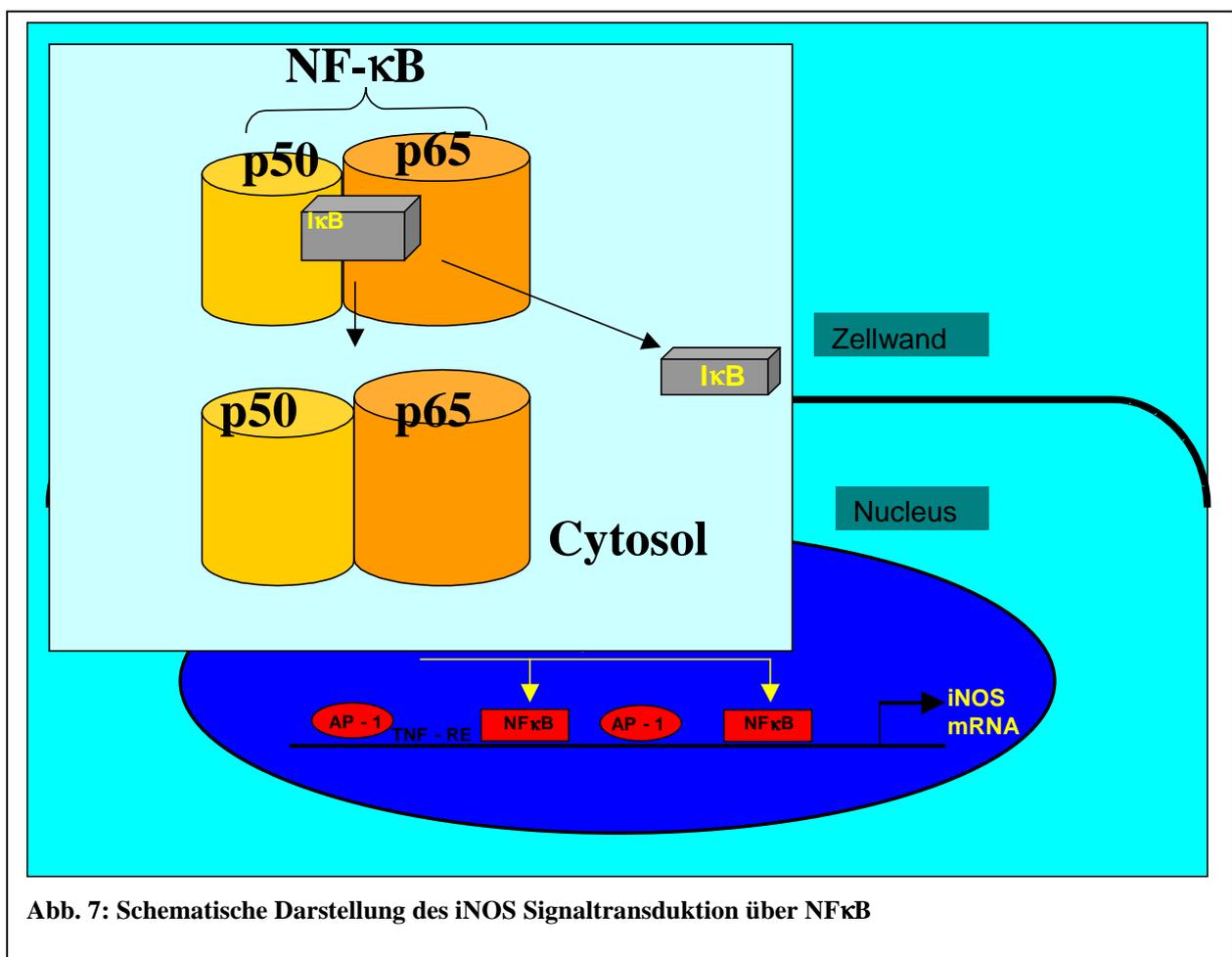


Abb. 7: Schematische Darstellung des iNOS Signaltransduktion über NF $\kappa$ B

Serin/Threonin Protein Kinasen, die eine bedeutende Rolle bei der Übertragung von extrazellulären Stimuli in den Nucleus spielen. Auf diese Weise werden Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Zellbewegung und Apoptose beeinflusst. Diese Signaltransduktion muss man sich bildlich wie ein hierarchisches System vorstellen. Schematisch ist dieses System in Abbildung 8 dargestellt. Es kommt durch Interaktion von Wachstumsfaktoren, Stress und Zytokinen über Rezeptoren an der Zelloberfläche zur Aktivierung von MAP – Kinasenkinasenkinasen (MAPKKK).

Nach Beginn auf dieser Stufe der Hierarchie kommt es durch Phosphorylierung zur Aktivierung der nächsttieferen Ebene (MAPKinasenkinasen – MAPKK) und schließlich zum Erreichen der letzten Stufe, der MAPKinase – ebenfalls durch Phosphorylierung.

Über die MAPK ERK 1/2 und JNK wird der Transkriptionsfaktors Aktivierungsprotein 1 (AP

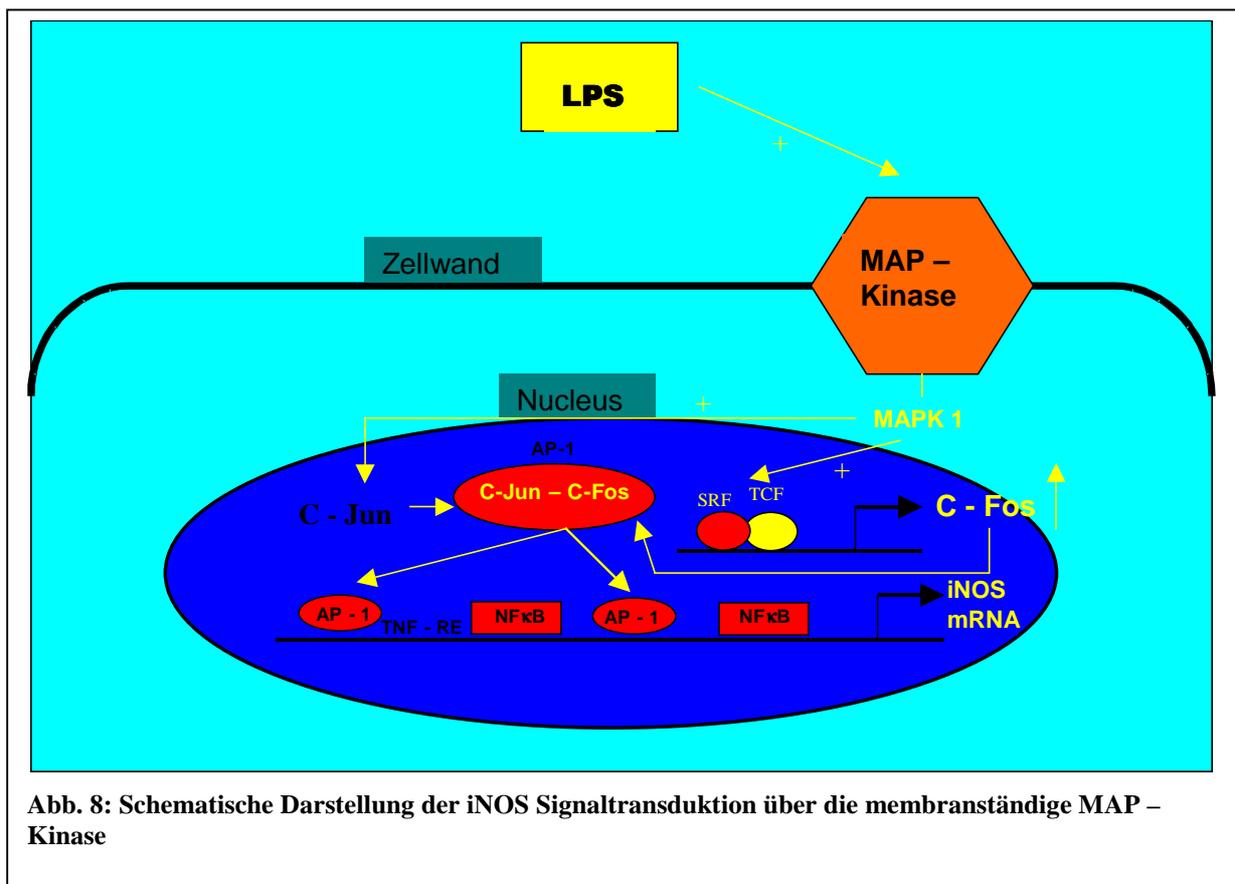


Abb. 8: Schematische Darstellung der iNOS Signaltransduktion über die membranständige MAP – Kinase

– 1) aktiviert, welcher an der Promotorregion der iNOS seinerseits die Transkription aktiviert. (s. Abbildung 8).

## ***1.9 Fragestellung***

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung des Urämietoxins PAA auf iNOS zu beschreiben. Des weiteren soll der Angriffspunkt von PAA in der Second Messenger – Kaskade der iNOS – Aktivierung identifiziert werden. Hierzu soll der Effekt sowohl auf Ebene der mRNA, als auch im Bereich von Protein und des Produktes (Nitrit) untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Materialien:

- RPMI 1640 Medium BiochromAG
- Fötale Kälberserum (FCS) Biochrom AG
- Penicillin/Streptomycin Biochrom AG
- Trypsin (0.05% + EDTA): Biochrom AG
- PBS (1x)
- Zellkulturflasche (25cm<sup>2</sup>) Falcon
- Zellkulturflasche (75cm<sup>2</sup>) Falcon
- Zellschaber (TTP)

#### 2.1.2 Makrophagen der Zellreihe RAW 264.7

In dieser Arbeit benutze ich Zellen der Reihe RAW 264.7 (Abelson murine leukemia virus-induced tumor). Die Kultivierung der Zellreihe erfolgt bei 37 Grad, unter 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre, in Kulturflaschen mit der Fläche von 25 cm<sup>2</sup>. Bis zu einer adhärenenten Wachstumsausbreitung (ca. 80% des Bodens der Kulturflasche) erfolgt die Ernährung der

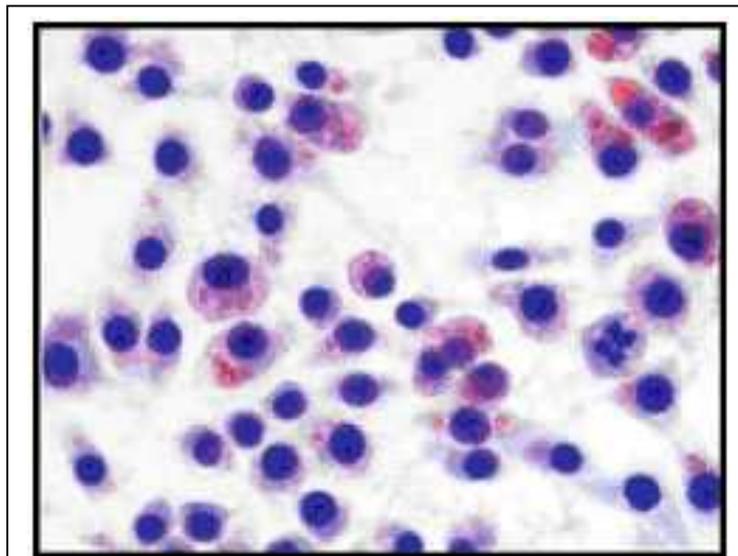


Abb. 9: Mikroskopische Darstellung von  
RAW 264.7

Zellreihe mit RPMI 1640 (10% FCS, 1 % Pen /Strep.). Bei subkonfluentem Wachstum erfolgte das Splitting der Zellen im Verhältnis 1:3. Zunächst wurden hierzu die Zellen in der Kulturflasche zweimal mit PBS gespült, danach 1ml Trypsin (0,05% + EDTA) hinzugegeben und nach einer Minute wurde das Trypsin abgesaugt. Anschließend lösten sich nach maximal drei Minuten die Zellen vom Plattenboden ab. Das Trypsin konnte nun mit 10 ml RPMI 1640 (10% FCS, 1 % Pen /Strep.) inaktiviert und die so erhaltene Zellsuspension für fünf Minuten bei 500g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet konnte nun mit RPMI (10% FCS, 1 % Pen /Strep.) resuspendiert und gleichmäßig auf 3 Kulturschalen verteilt.

Zur Durchführung von Versuchen wurden subkonfluente Zellen zunächst für 24 Stunden mit „Hungermedium“ RPMI 1640 (1% FCS, 1 % Pen /Strep.) inkubiert, bevor eine Stimulation mit verschiedenen Substanzen in RPMI 1640 (1% FCS, 1 % Pen /Strep.) erfolgte.

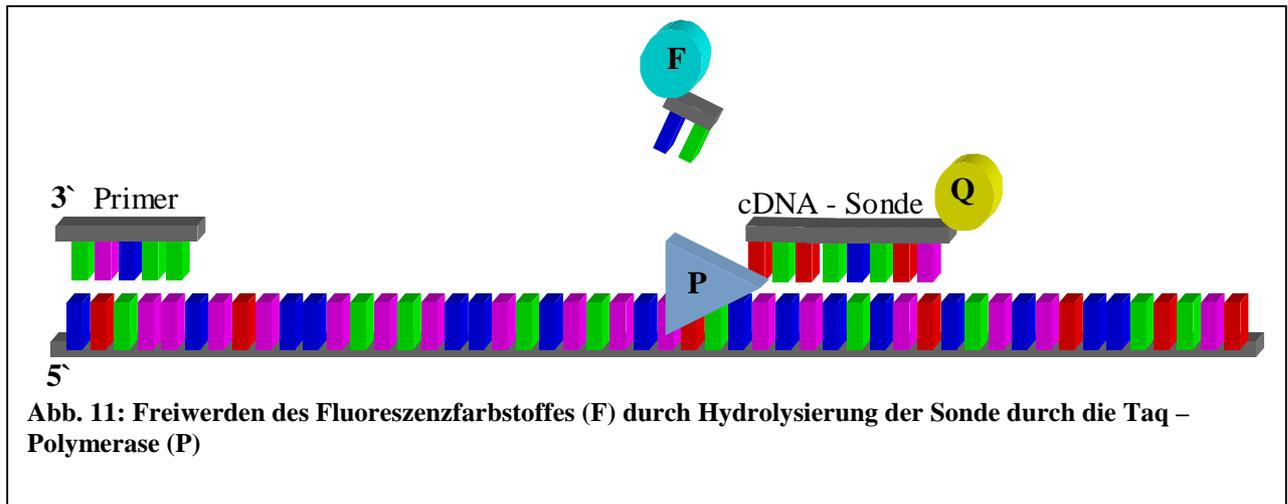
## **2.2 TaqMan**

### **2.2.1 Das Grundprinzip der Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)**

Bei der Polymerase – Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren, um beliebige DNA – Abschnitte zu vervielfältigen. Schöpfer dieses Verfahrens war in den achtziger Jahren K.B. Mullis, der 1993 für diese Leistung den Nobelpreis für Chemie erhielt. Als Grundlage dienen zwei Oligonukleotide (Primer), die jeweils komplementär zu einem der Stränge der zu amplifizierenden DNA sind. Zunächst wird die DNA bei 95 °C in zwei Einzelstränge denaturiert. Diesem, als „heating“ bezeichneten Vorgang, folgt eine rasche Abkühlung auf 50 °C, woraufhin dann die Oligonucleotide (Primer) hinzugegeben werden. Diese lagern sich an die 5`- Enden der beiden Einzelstränge an. Dieser Ablauf wird als „Annealing“ bezeichnet. Durch Zusatz einer DNA – Polymerase werden die beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang komplementiert. Diese Polymerasen stammen von thermophilen Bakterien (*Thermophilus aquaticus*), die auch bei Temperaturen von 100 °C ihre Aktivität noch behalten. Dadurch ist es möglich, ohne erneutes Hinzupipettieren eines „frischen“ Enzymes, die Replikationszyklen regelmäßig zu wiederholen. So wird eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA erreicht. (Nach 25 Zyklen ist die Zielsequenz auf etwa das 10<sup>6</sup> – fache amplifiziert.)

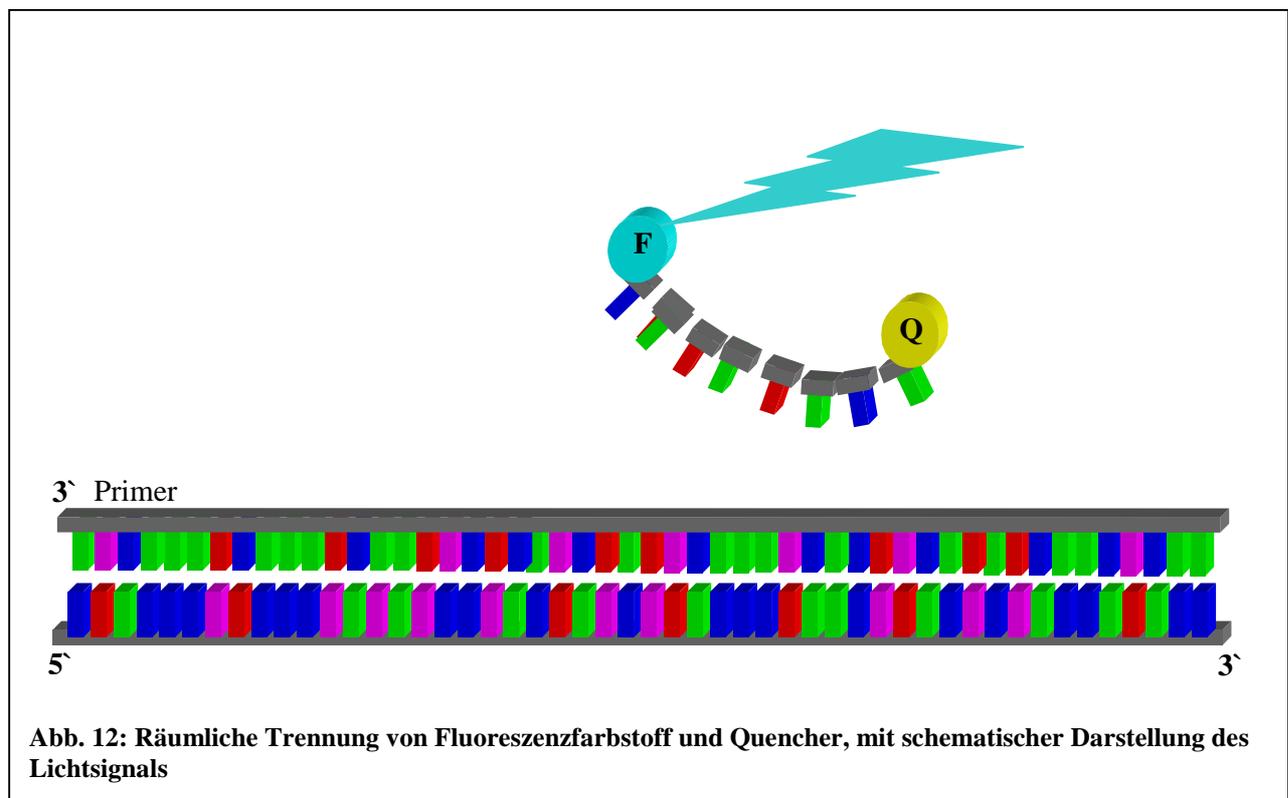
So macht dieses Verfahren die Detektion von DNA möglich, auch wenn diese nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist.



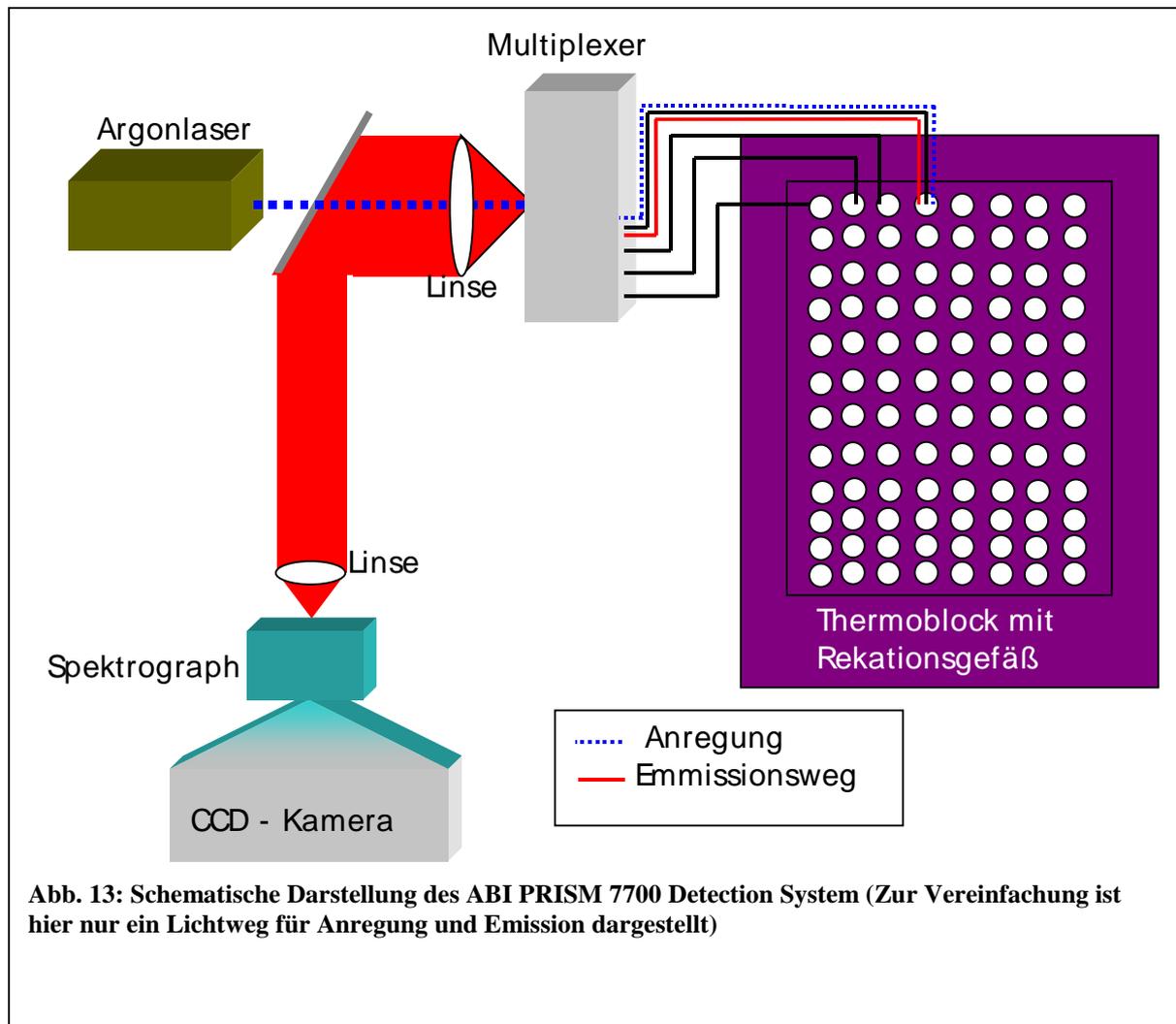


Anregung der Sonde mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 488\text{nm}$  wird das Fluoreszenzsignal solange inhibiert, wie eine räumliche Nähe zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und dem Quencher besteht. (Fluoreszenz- Energietransfer nach Förster et al.1948)

Wird durch die hybridisierte Sonde jedoch die räumliche Nähe zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und dem Quencher aufgehoben, kann man die Fluoreszenz am 5'- Ende messen und es steigt entsprechend die mit jedem Reaktionszyklus zunehmenden DNA – Menge an (s. Abbildung: 12).



Dies ist die Grundlage für das „ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System“. Zunächst wird durch ein Argonlaser (Wellenlänge 488nm) über einen dichroitischen Spiegel auf einen Multiplexer geschickt, in dem das Signal auf 96 POFs („plastic optical fibers“) aufgeteilt wird. Durch die Verbindung der POFs mit dem Heizdeckel ist es möglich, die Fluoreszenzemission der enzymatisch gespaltenen Sonde anzuregen. Der gleiche optische Leiter des Laserstrahls dient nun auch der Fluoreszenzemission als „Rückweg“. Da sie jedoch eine andere Wellenlänge als der Laser besitzt, wird sie vom dichroitischen Spiegel reflektiert, über eine Linse fokussiert und schließlich über einen Spektrographen auf eine CCD – Kamera weitergeleitet, welche das optische in ein digitales Signal umwandelt.



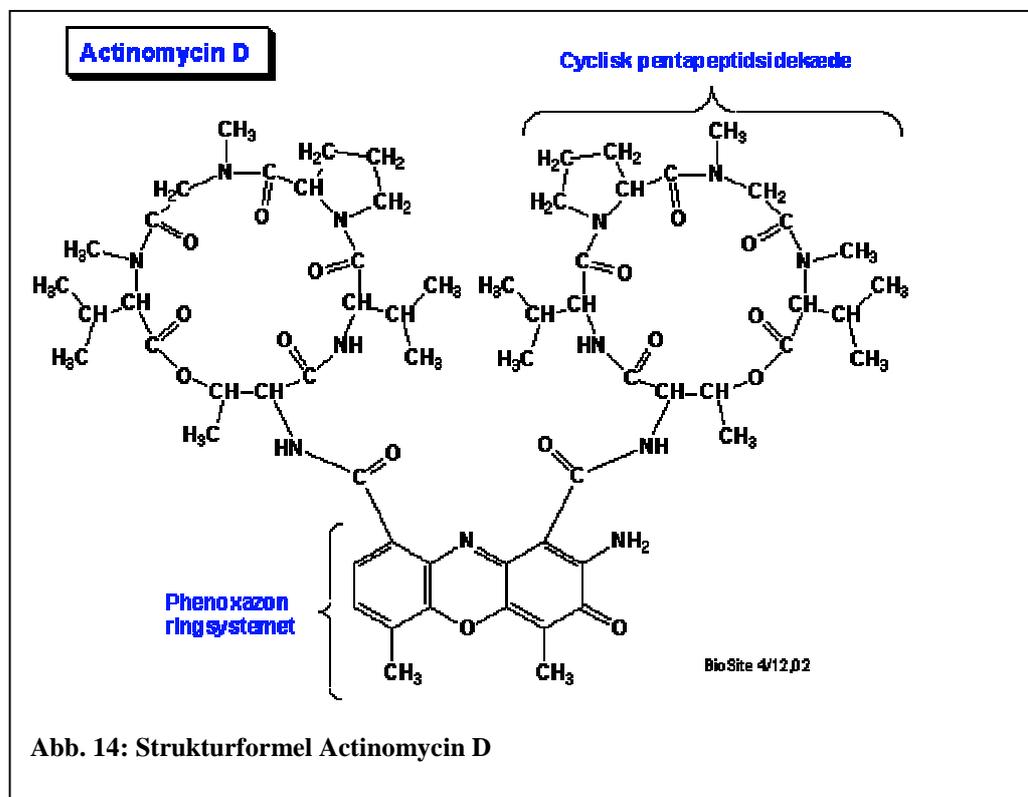
So kann die Veränderung der Fluoreszenz im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus in Echtzeit erfasst werden. (s. Abbildung: 13)

Entscheidend für die Quantifizierung und die Erstellung von Standardkurven ist der sogenannte Ct-Wert, ein Schwellenwert. Dieser Wert repräsentiert die Zyklusnummer, ab der die Fluoreszenzemission der Probe eine Fluoreszenz zeigt, die über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

Zur Quantifizierung des Signals wird die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewandt. Bei diesem semiquantitativen Verfahren wird das Signal einer unbekannt Menge der Zielsequenz auf das Signal einer endogenen Kontrolle abgeschätzt und mit einem Referenzwert verglichen. Als endogene Kontrolle diente uns das „Housekeeping–Gene“  $\beta$ -Actin. Die Menge von  $\beta$ -Actin in einer Zelle wird durch verschiedene Stimuli nicht verändert.

### 2.2.2 Bestimmung der Halbwertszeit von iNOS mRNA

Hierzu wurden RAW 264.7 Zellen ebenfalls mit LPS (1 µg/ml) und IFN - γ (100IE/ml) für 6h unter Hinzugabe oder Abstinenz verschiedener Konzentrationen von PAA stimuliert. Nach Stimulation wurde die Transkription durch Hinzugabe von Actinomycin D inhibiert. Das Antibiotikum Actinomycin D wird aus *Streptomyces antibioticus* gewonnen und besitzt die Eigenschaft an DNA zu binden und so Enzyme der Replikation und Transkription zu behindern. Klinisch findet Actinomycin D Anwendung zur Therapie des Wilms – Tumors,



des Rhabdomyosarkoms, sowie bei verschiedenen Hoden- und Uterustumoren. Das Molekül besteht aus einem Phenoxazon – Ringsystem, an das zwei zyklische Pentapeptide gebunden sind.

Nach Stimulationszeiten von zwei, vier und sechs Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert. INOS und β-Actin mRNA wurden semiquantitativ durch die Realtime-PCR vermessen. Aus der Menge an mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten kann mittels Regression die Halbwertszeit der RNA bestimmt werden. Der Einfluss von PAA auf die Halbwertszeit der iNOS mRNA konnte so untersucht werden.

## 2.3 Westernblott

### 2.3.1 Reagentien und Materialien

- Protein – Lyse – Puffer: 10 ml 50mM Tris-HCl Puffer (pH7.4); 100 µl Triton X100; Complete – Mini (Proteinaseinhibitorcocktail)
- Lauffpuffer (10x): Tris Base (30g); Glycine 72g; SDS 5g; gelöst in 1000ml ddH<sub>2</sub>O
- Laemmli – Puffer: ddH<sub>2</sub>O 3,8 ml; 0,5 M Tris – HCL (pH6,8); Glycerol (0,8 ml); 10% SDS; 2-mercaptoethanol 0,4 ml; 1% Bromophenol Blue
- Semi-dry –Puffer (1x): Tris Base (5.8g); Glycine 2,9 g; SDS 0,37g; Methanol (20%) 200ml; gelöst in 1000ml ddH<sub>2</sub>O
- TBS 10x (pH: 8.0): 80g NaCl; 2 g KCl; 30g Tris Base,
- Tween TBS (0,1%): 1X TBS; 1ml Tween
- 1.5 M Tris – Puffer (pH 8.8): 181,78 g Tris Base in 1000ml ddH<sub>2</sub>O gelöst
- 1 M Tris – Puffer (pH 6.8): 121.14g Tris Base in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst
- 50mM Tris – Puffer (pH7,4): 7.88g Tris – HCl in 1000ml H<sub>2</sub>O gelöst
- APS (10%)
- SDS (10%)
- Non fat far dry milk (5%;0,5%)

### 2.3.2 Isolierung von Gesamtprotein

Die Proteine wurden aus RAW 264.7 gewonnen. Zunächst lösten wir durch Trypsinierung (0.05% für 2-5 Minuten) die Zellen vom Kulturboden, darauf folgte eine Zentrifugierung bei 800g für 5 min. Das so gewonnene Pellet, wurde in einem Protein – Lyse – Puffer lysiert. Um einer komplette Lyse zu erreichen mussten die Zellen in einem Ultraschallbad für fünf Minuten aufgeschlossen werden. Für die Trennung von Zelldetritus und Protein, wurden die Proben in einem letzten Schritt für 20 min bei 4 Grad zentrifugiert (20.000g).

Die Vermessung der gewonnenen Proteine erfolgte mit Hilfe von BCA Assay -Kit der Firma Pierce.

Die isolierten Proteine konnten dann bei –80 Grad eingefroren werden.

### 2.3.3 Isolierung von nukleären Protein

Zur Isolierung von nukleärem Protein wurden die stimulierten RAW 264.7 aus den Kulturflaschen abgelöst und mit eiskalten PBS gewaschen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen führte zur Zerstörung der Zellmembranen. Die weitere Lyse erfolgte durch die Hinzugabe eines hypotonen Lyse – Puffers, bestehend aus 10mM-Hepes-KOH, 10 Millimeter KCl, 1 Millimeter DTT, 0,1mM EGTA, IGEPAL und einem Proteaseinhibitorcocktail. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 G (4°C) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, cytosolische Proteine enthaltend, konnte abpipettiert werden und das Pellet in einem hypertonen Puffer (20mM-Hepes-KOH, 400 mM NaCl, 10 mM, 50 mM DTT, 1mM EGTA, das 25%-Glycerin, IGEPAL, Proteaseinhibitorcocktail) erneut lysiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 30 Minuten (13.000g). Das nun im Überstand enthaltene Kernprotein wurde abpipettiert, anschließend mit Hilfe des BCA – Assays die Konzentration bestimmt und bei –80°C eingefroren.

### 2.3.4 Isolierung von Phosphoprotein

Zellen wurden mit LPS (1µg/ml) und IFN-γ (100U/ml) über verschiedene Zeiträume (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 und 90 min.) ohne und unter Hinzugabe von PAA (1mM und 5mM) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Nach den angegebenen Zeiträumen wuschen wir Zellen mit eiskalten PBS, um die Stimulation zu stoppen.

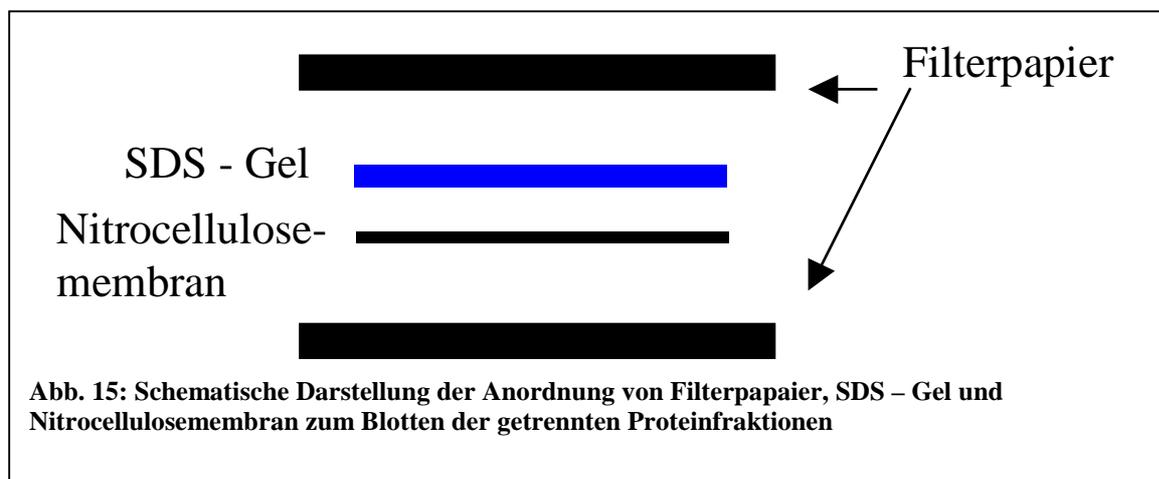
Anschließend wurden die Zellen von den Kulturplatten abgelöst und in einem Phospho-Protein-Lyse-Puffer (BioRad, München, Germany) lysiert. Dieser Puffer enthält einen Cocktail von Protease- und Phosphataseinhibitoren. Überdies wurden die Zellmembranen durch ein Ultraschallbad für 2 Minuten aufgeschlossen und dann für 20 Minuten bei 4°C (4500g) zentrifugiert. Wir pipettierten die Überstände – das Phosphoprotein enthaltend – ab.

Die Vermessung der Phosphoproteine erfolgte als Triplets. Wir benutzten das Bioplex Protein Array system (BioRad, München, Germany). Die Funktionsweise des Systems ist im noch folgenden Methodenteil (2.6) dargelegt. Mit dem von uns benutzten Assay konnte zum einen eine Quantifizierung von ERK1/2, JNK und p38 MAPK vorgenommen werden, zum anderen auch der Phosphorylierungsgrad bestimmt werden.

### 2.3.5 Durchführung des Westernblottes

Zur Gelpräparation diente das Mini-Protean 3 Electrophoresis-Cell® der Firma Bio-Rad® benutzt. Es wurde ein 8% SDS - Gel als Laufgel und ein 5% Sammelgel benutzt. Die Geldicke betrug immer 1 mm.

Bei dem oben genannten System stehen pro angefertigtem Gel 10 Vermessungseinheiten (Lan) zur Verfügung. Für jedes Lan wurde eine Proteinkonzentration von 40µg/µl eingesetzt. Die Probe verdünnten wir im Verhältnis 1:1 mit Laemmli – Puffer und erhitzen sie vor dem



Auftragen auf das Gel für 4 Minuten auf 95 Grad. Das Gemisch aus Laemmli – Puffer und Proteinlysate pipettierten wir dann in jede Lan.

Proteine werden dann bei 150 V (10 min) an der Grenzlamelle von Sammel- und Trenngel angehäuft und durchlaufen daraufhin für 90 Minuten (100V) das Trenngel.

Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Für das Blotting wurde eine Spannung von 20 V (30 min) benutzt.

In einem nächsten Schritt wurden die Membranen in Ponceau S für 5 min eingefärbt. An dieser Stelle konnte beurteilt werden, ob eine korrekte Trennung der Proteine stattgefunden hatte. Hinterher wurden die Membranen mit TBS entfärbt und für eine Stunde in 5% Notfatdrymilk (Blocking Buffer) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu lösen.

Zur Detektion der verschiedenen Proteine wurde der primäre Antikörper in 0,5% Notfatdrymilk verdünnt ( $\beta$ -Actin 1:5000; iNOS 1:250). Die Inkubation erfolgte bei 4 Grad für 15 – 18 Stunden. Die Verdünnung des sekundären Antikörpers fand ebenfalls mit 0,5%

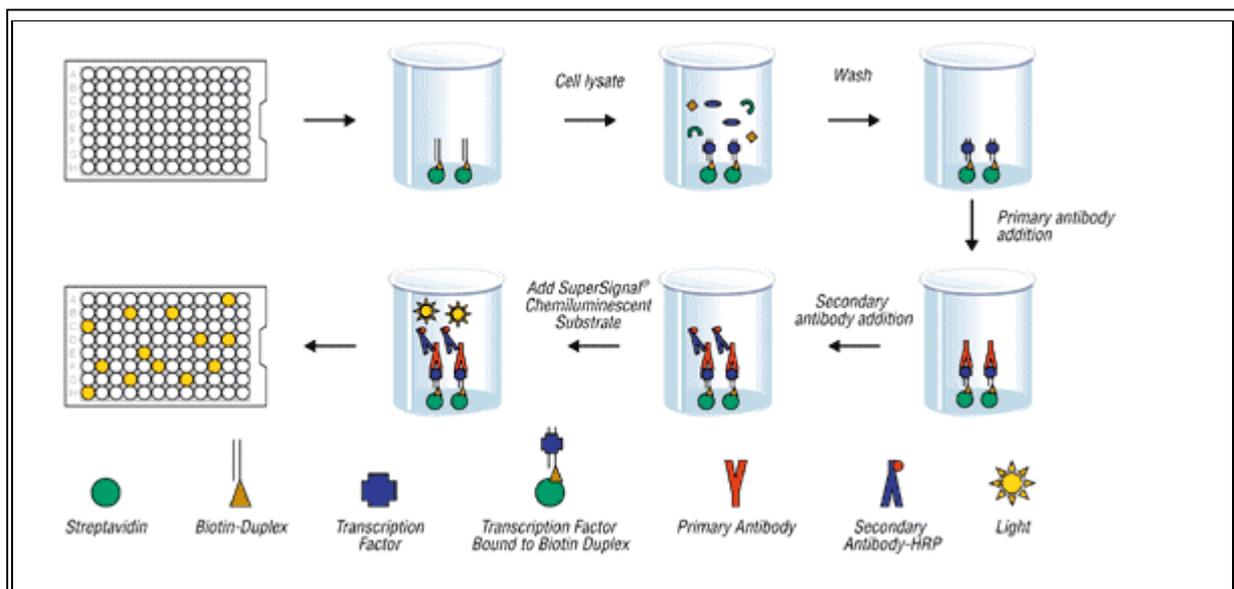
Notfatdrymilk (Anti-MouseIgG 2A 1:2500) statt, der daraufhin für 90 Minuten bei 4 Grad inkubiert wurde. Nach beiden Inkubationen wurden die Membranen mit TBS und TBS T für je 10 Minuten gewaschen.

Die Detektion wurde mit Hilfe des „Santa – Cruz Detektions – Kits“ durchgeführt. Die Belichtungszeiten betragen für  $\beta$  - Actin 10 Sekunden, für iNOS 1 – 2 Minuten.

## 2.4 NF $\kappa$ B – Assay

Die Bestimmung des Signaltransmitterproteins NF $\kappa$ B erfolgte mittels ELISA. Hierfür wurde das EZ – Detect™ NF $\kappa$ B p65 Transcriptions-Factor Kit der Firma Pierce® benutzt.

Zur Gewinnung von Kernprotein verwendeten wir das oben beschriebenen Verfahren. Das gesamte Extrakt wurde mit 50  $\mu$ l Binding Buffer für eine Stunde bei Raumtemperatur unter



**Abb. 16: Schematische Darstellung der Funktionsweise des EZ – Dettect™ NF $\kappa$ B p65 TranscriptionsFactor Kit**

langsamer Rotationsbewegung hinzugefügt. Während dieser Inkubation bindet das in der Probe enthaltene NF $\kappa$ B an den mit Streptavidin beschichteten Plattenboden. Anschließend erfolgte die Hinzugabe des primären Antikörpers. Nach Spülung der Platten mit Waschpuffer fügten wir dann den sekundären Antikörper hinzu. Abschließend wurde die Menge an NF $\kappa$ B p65 mittels SuperSignal Chemiluminescent Substrate© sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Menge an NF $\kappa$ B p65 erfolgte durch die Detektion mit einer CCD- Kamera. Zusätzlich

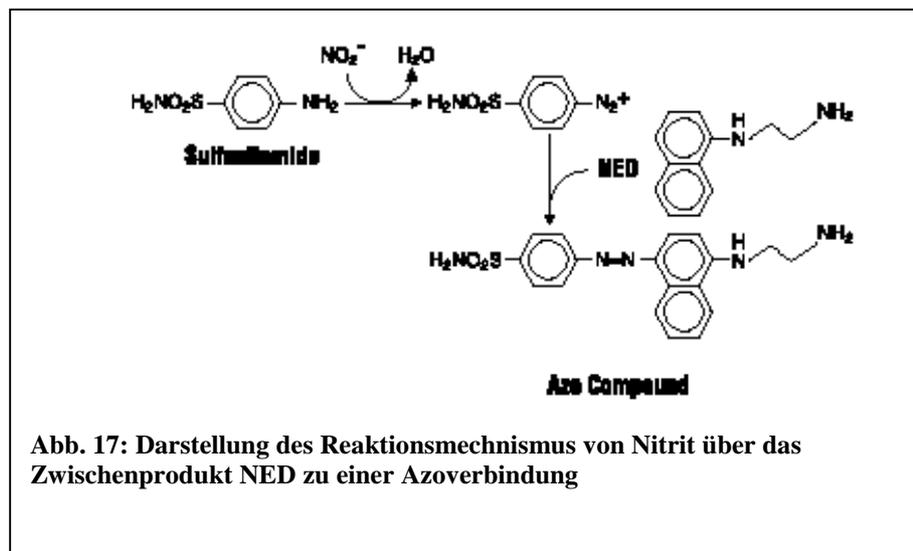
wurde zu jedem Versuch als Positivkontrolle Extrakt aus aktivierten HeLa- Zellen und eine Leerprobe in die Vermessung miteinbezogen.

## 2.5 Detektion von Stickstoffmonoxid (NO)

Da NO nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat, benutzten wir zur Detektion das Abbauprodukt Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ).

Aus den Zellkulturflaschen wurden unter sterilen Kautelen 500  $\mu\text{l}$  Medium entnommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

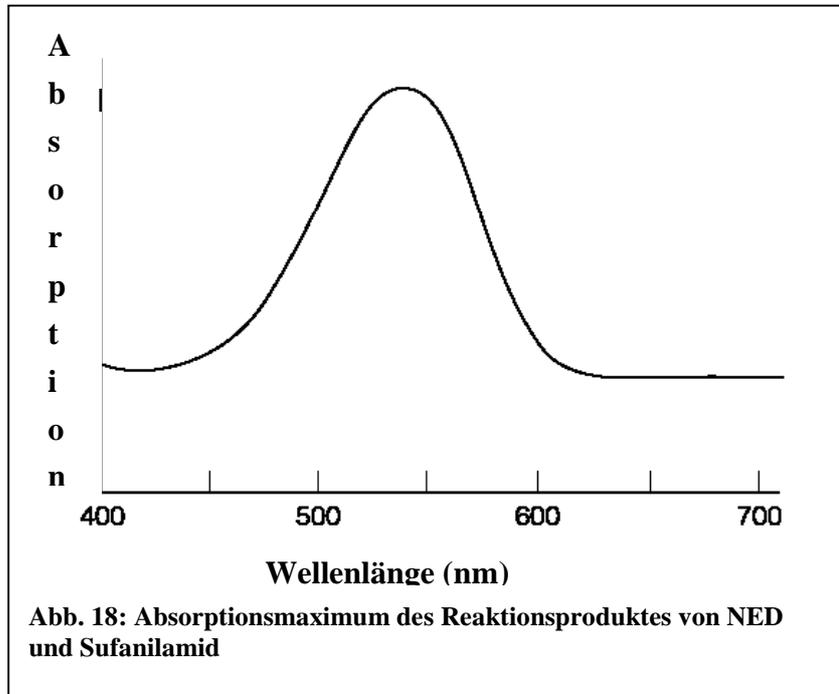
Zur Analyse wurde das „Griess Reagent System“<sup>®</sup> der Firma Promega<sup>®</sup> benutzt. Diese



Vermessung geht zurück auf einem Chemolumineszenzverfahren, dass 1879 von Mr. Griess erfunden wurde.

Das Griess System beruht auf einer chemischen Reaktion, die in Abbildung 17 dargestellt wird.

Die diesem System zugrundeliegende Reaktion wird Sulfanilamid unter sauren Bedingungen mit Nitrit zu einem Zwischenprodukt umgebildet, welches unter der Zugabe von N-1-



Naphtylethylendiamin-Dihydrochlorid (NED) zu einer Azoverbindung reagiert. Dieses Reaktionsprodukt hat ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda=520$  nm. (s. Abbildung: 18)

Eine Standardkurve mit einem Nitrit Standard im Bereich von  $100\mu\text{M}$  bis zu  $1.56\mu\text{M}$  wurde erstellt. Die Standardkurve wurde in RPMI 1640 (1% FCS, 1 % Pen /Strep.) verdünnt.

Die Vermessung der Proben erfolgte in Triplets. Zu jeder Probe und zu den Proben der Standardkurve wurden nun  $50\mu\text{l}$  der Sulfanilamid – Lösung hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Hinzugabe von  $50\mu\text{l}$  der NED – Lösung auf alle Wells.

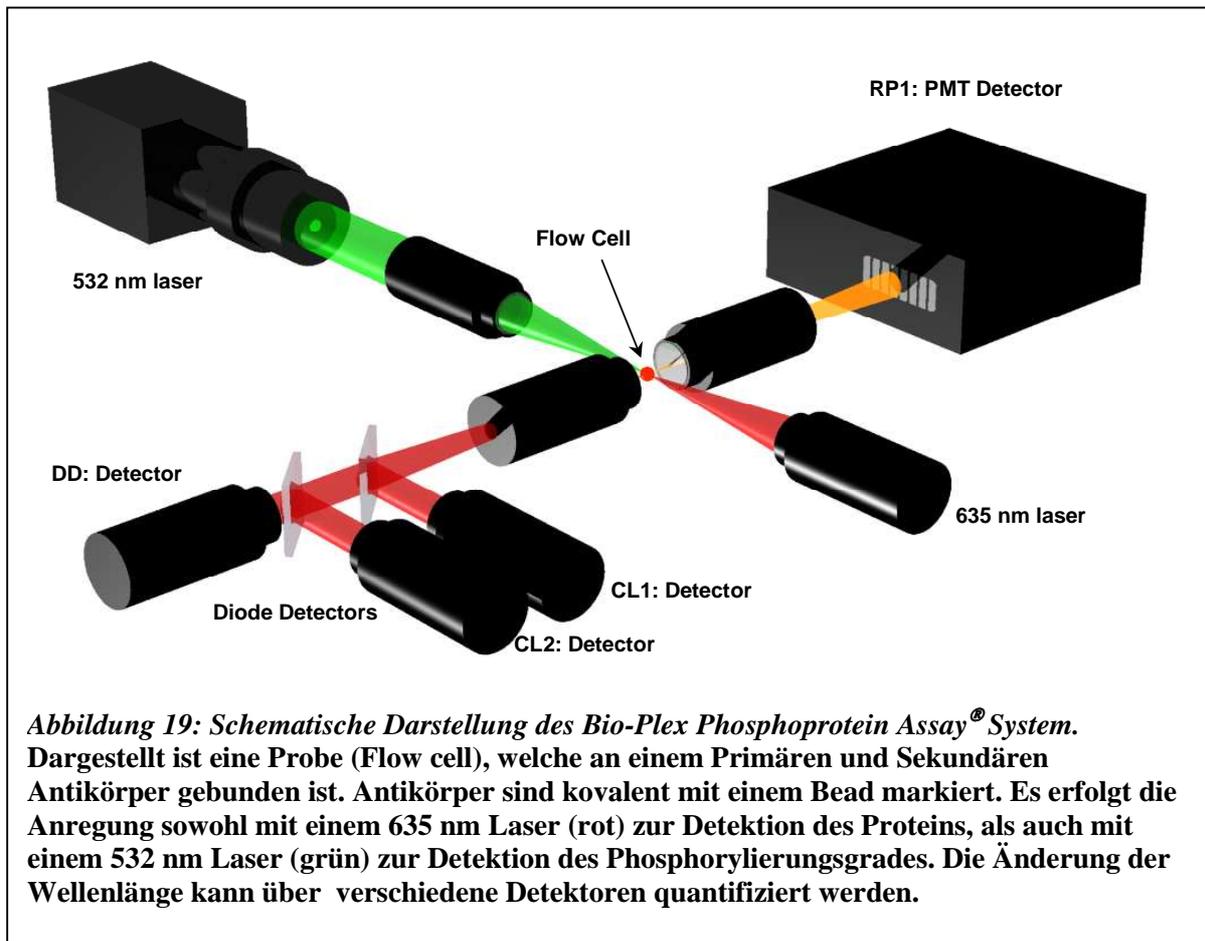
Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten erfolgte die Vermessung mit einem Plate – Reader (iEMS Reader, Labsystems, Helsinki, Finnland) bei einer Absorption von 520 nm.

## 2.6 Bioplex

Der Bio-Plex Phosphoprotein Assay<sup>®</sup> ist eine neuartige Nachweismethode, die auf der LuminexMAP Technology basiert. Mit dieser Technik ist es möglich, phosphorylierte Formen der Proteine in Zelllysaten zu detektieren. Die Besonderheit und damit einhergehend der Unterschied zu bisherigen Assaymethoden besteht zu einem in der Möglichkeit bis zu 100 verschiedene Proteine in einer Probe gleichzeitig nachzuweisen, zum anderen in der Tatsache, dass nur ein sehr geringes Zelllysativolumen notwendig ist, um Messungen vorzunehmen.

Das Prinzip des Bio-Plex Assays ist ähnlich der Messmethode des Sandwichimmunassays. Auch hier wird ein Antikörper gegen ein Zielprotein gerichtet, und diese kovalente Bindung mit Hilfe einer Markierungssubstanz sichtbar gemacht, um dann mit Hilfe von verschiedenen Detektionssystemen erfasst werden zu können.

Zunächst wurden die für den Assay benötigten Proteine isoliert. Als Kulturplatten verwendeten wir bei diesem Versuch 8 Well Plates mit einer Fläche von 4 cm<sup>2</sup>. Nach Stimulation der Zellen über verschiedene Zeiträume (5, 10, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten) wurden die begonnenen Reaktionen zunächst durch Kühlung auf 4°C und Spülung mit eiskaltem PBS gestoppt. Die in vorangegangenen Versuchen durchgeführte Ablösung der Zellen durch Trypsinierung fiel an dieser Stelle weg, da die einminütige Einwirkung durch Trypsin bereits einen stark stimulierenden Effekt auf die Zellen ausübt und dabei die Ergebnisse für die oben genannten kurze Zeiträume verfälscht hätte. Die Zellen wurden direkt auf der Platte in einem speziellen Lysepuffer lysiert. (Zusammensetzung für 10 ml: 9.94 ml Lysepuffer Bio – Rad; 40 µl Faktor 1 Bio – Rad; 20 µl Faktor 2 Bio – Rad; 1 Tablette Complete Mini Roche). Danach folgte ein 2 minütiger Zellaufschluss in einem Ultraschallbad bei 4 °C und daraufhin eine erneute Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C für 25.min. Der jetzt im Überstand enthaltenen Proteine wurden abpipettiert und vermessen. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei –80°C.



Zunächst wird ein bestimmtes Protein des gewonnenen Lysates an einen Antikörper gekoppelt. Dieser Antikörper ist kovalent an einen „Bead“ gebunden. Dieser Bead trägt eine für das Protein spezifische rote Farbkodierung. Nach Bindung an das entsprechende Zielprotein wird eine Reihe von Waschungen durchgeführt, um ungebundene Proteine zu eliminieren. Es wird nun ein zweiter Antikörper gebunden, der für die Phosphorylierung spezifisch ist. Dieser Antikörper wird über Streptavidin – Pycoerythrin, einem grünen Farbstoff, detektiert.

Zur Detektion wird nun die Probe durch zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt (635 nm und 523 nm). Die durch die Anregung des Beads mit dem ersten Laser (635 nm) kommt es zu einer Veränderung der Wellenlänge des ausgesandten Lichtes. Diese Veränderung kann durch Detektoren aufgefangen werden und so das jeweilige Protein identifiziert werden. Über den zweiten Laser wird nun der grüne Farbstoff angeregt und so über den oben geschilderten Mechanismus der Phosphorylierungsgrad bestimmt. (s. Abbildung 19)

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die mit dem Bio-Plex Phosphoprotein Assay<sup>®</sup> bestimmbaren Proteine.

**Tabelle 1: Liste der mit dem Bio-Plex Phosphoprotein Assay<sup>®</sup> bestimmbaren Proteine. Dargestellt sind in der zweiten Spalte die Proteine, von welchen der Phosphorylierungsgrad und in der dritten Spalte die, von welchen die Gesamtproteinmenge bestimmt werden kann.**

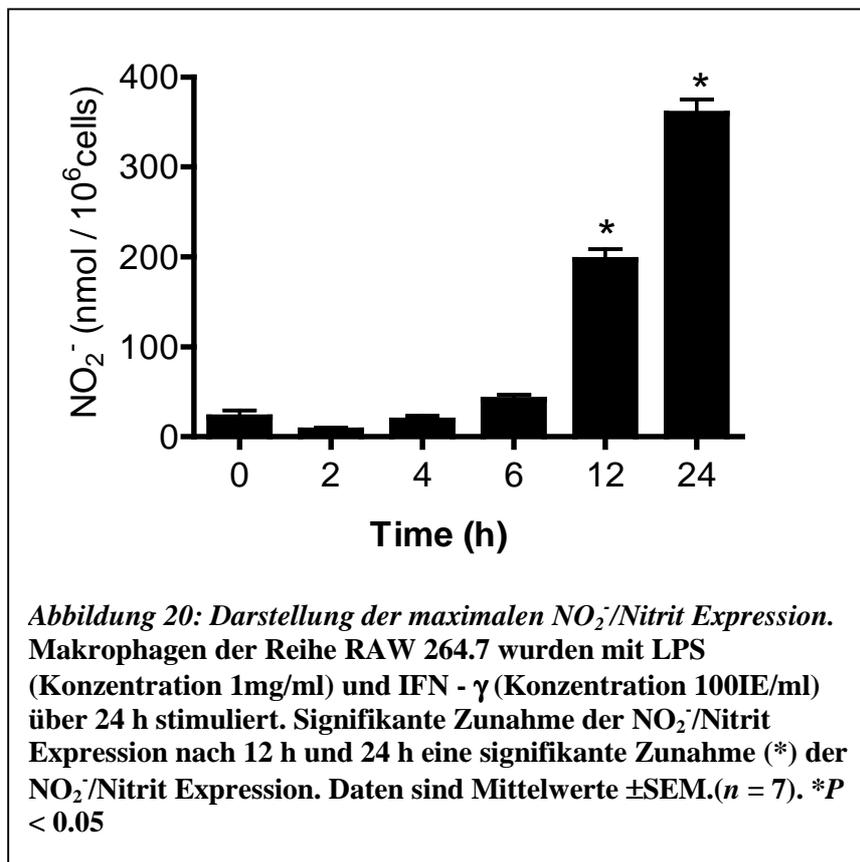
Bestimmbare Proteine	Phosphoprotein Assay	Total target assay
Akt	+	+
ATF – 2	+	+
EGFR	+	
ERK – 1	+	
ERK – 2	+	+
ERK 1 – 2	+	
GSK – 3 $\alpha/\beta$	+	
I $\kappa$ B - $\alpha$	+	+
JNK	+	+
P 38 MAPK	+	+
P 70 S 6 Kinase	+	
P 90 RSK	+	+
Stat 2	+	
Stat 3	+	
Trk A	+	

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Feststellung der Zeitpunkte der maximalen Expressionen

##### 3.1.1 Zeitpunkt der maximalen $\text{NO}_2^-$ - Stimulation

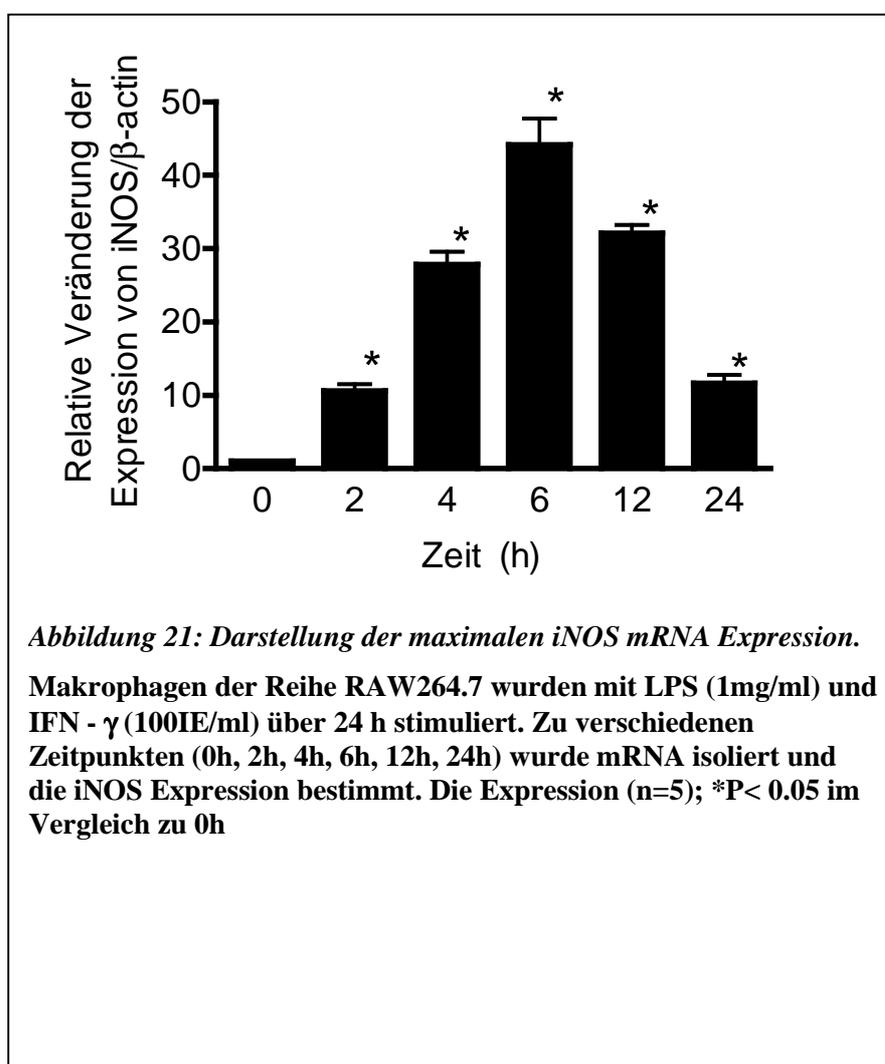
Es wurde die Zeitabhängigkeit der Expression von  $\text{NO}_2^-$  nach Stimulation von Makrophagen der Reihe RAW 264.7 mit LPS (Konzentration 1mg/ml) und IFN -  $\gamma$  (Konzentration 100IE/ml) untersucht. Es zeigte sich nach 12 Stunden eine signifikante Zunahme der  $\text{NO}_2^-$



Expression. Die Mittelwerte lagen nach 0h bei 21,711 nmol/ $10^6$  Zellen. Nach 12 Stunden ergab sich eine signifikante Zunahme von  $\text{NO}_2^-$  auf 196,68 nmol/ $10^6$  Zellen und schließlich nach 24 Stunden ein Maximum von 359,51 nmol/ $10^6$  Zellen. (s. Abbildung 20)

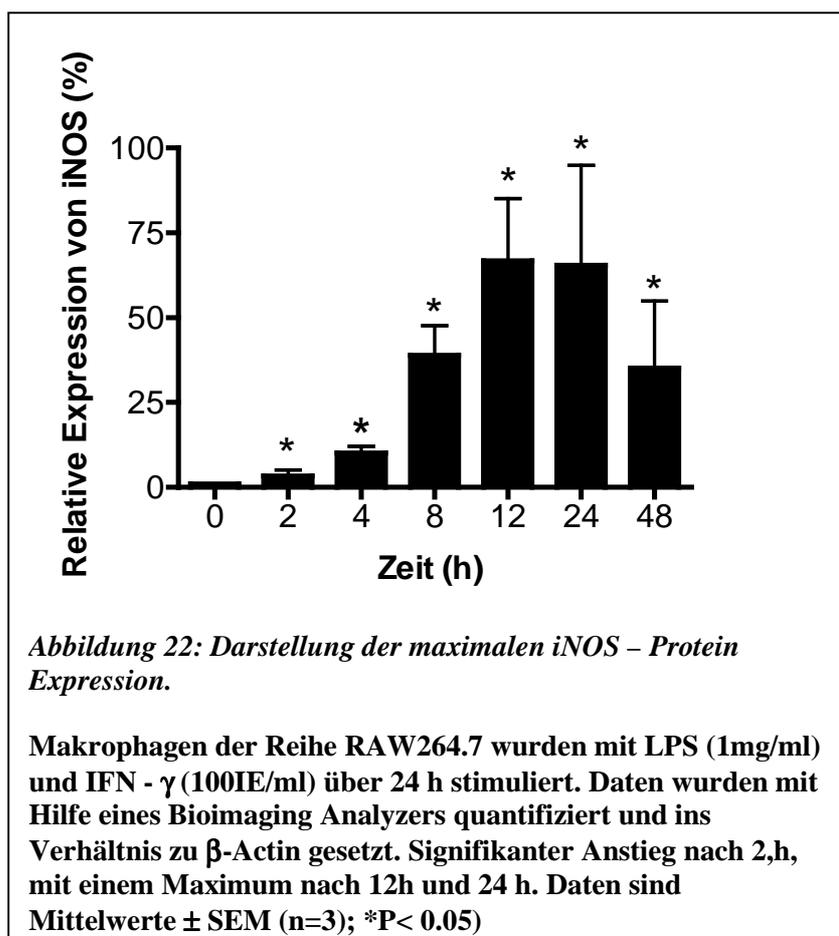
### 3.1.2 Zeitpunkt der maximalen iNOS mRNA Stimulation

Wir untersuchten die Zeitabhängigkeit der Expression von iNOS mRNA. Makrophagen der Reihe RAW 264.7 wurden mit LPS (1mg/ml) und IFN -  $\gamma$  (100IE/ml) über 24 h stimuliert. Es erfolgte die Isolierung der mRNA nach 0, 2, 4, 6, 12 und 24h. Die Expression wurde mit Hilfe der Real-Time PCR (TaqMan) bestimmt. Die Expression der iNOS mRNA wurde quantifiziert und ins Verhältnis mit der von  $\beta$ -Actin gesetzt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von iNOS mRNA ab 2 Stunden (iNOS/ $\beta$ -Actin = 10,6 fach vs. 0h) mit einem Maximum nach 6h (iNOS/ $\beta$ -Actin = 44,2fach vs. 0h). (s. Abbildung 21)



### 3.1.3 Zeitpunkt der maximalen Protein Stimulation

Es wurde die Zeitabhängigkeit der Expression von iNOS – Protein untersucht. Makrophagen der Reihe RAW264.7 wurden mit LPS (1mg/ml) und IFN -  $\gamma$  (100IE/ml) über 48 h stimuliert. Nach 2, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden erfolgte die Proteinisolierung nach dem im Methodenteil



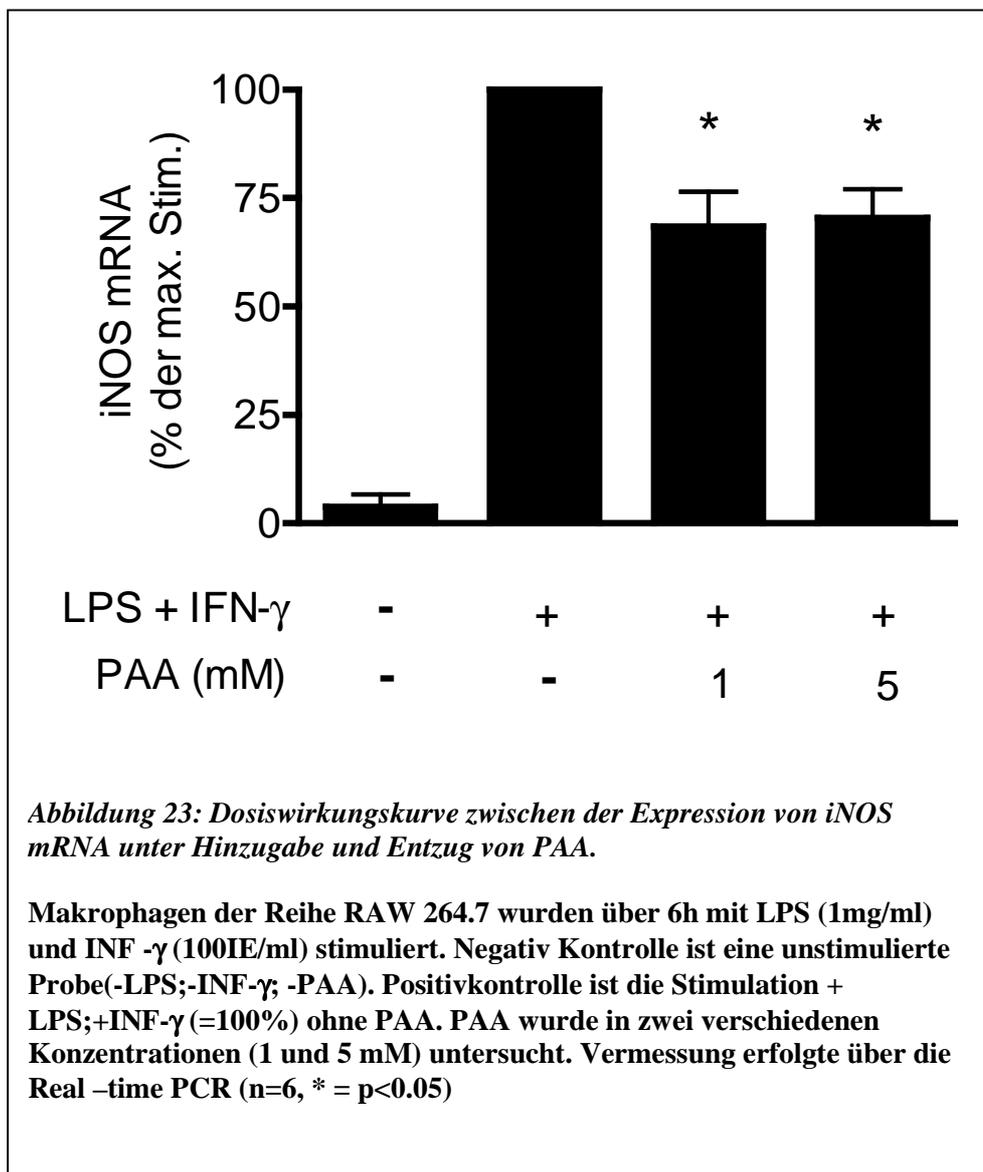
beschriebenen Verfahren. Es ergab sich eine Zeitabhängigkeit der Stimulation, mit einem signifikanten Anstieg nach 2h (3,4fach vs. 0h) und einem signifikanten Maximum nach 12h (66,8fach vs. 0h) und 24 h (65,5fach vs. 0h).

### 3.2 PAA inhibiert die Cytokininduzierte iNOS Expression in RAW 264.7 Makrophagen

Wir untersuchten die Auswirkung von PAA auf die Expression von iNOS mRNA, iNOS – Protein und Nitrit Produktion in RAW 264.7 Zellen.

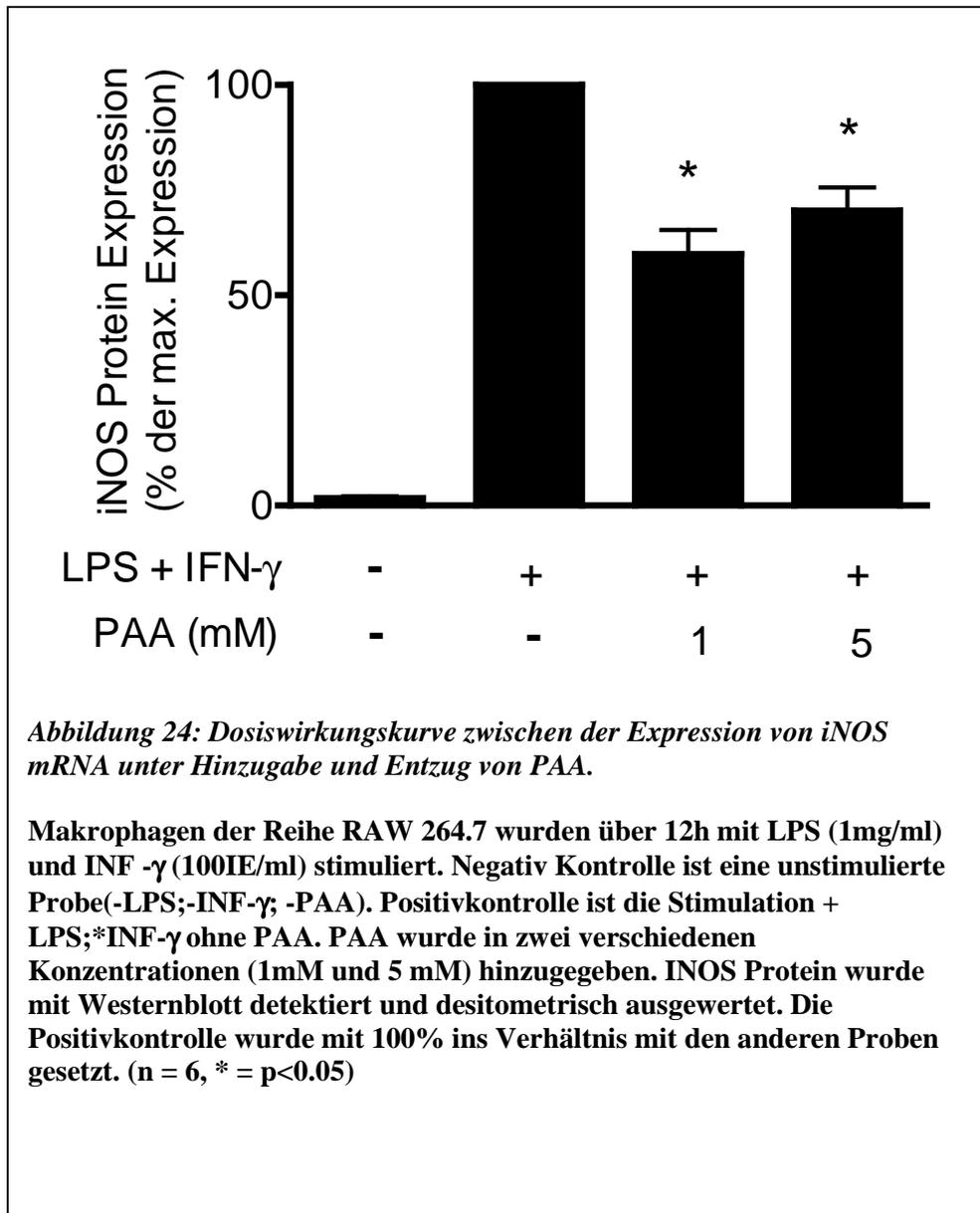
#### 3.2.1 iNOS mRNA Expression unter der Einwirkung von PAA

Makrophagen der Reihe RAW 264.7 wurden mit LPS (1mg/ml) und IFN -  $\gamma$  (100IE/ml)



stimuliert und die iNOS mRNA Expression mit verschiedenen Konzentration von PAA (1mM und 5mM) gehemmt. Nach einer Stimulationszeit von 6h wurde die iNOS mRNA isoliert und die Menge der mRNA und durch die Real Time PCR quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der iNOS mRNA bei PAA Konzentrationen von 1 mM und 5mM. Diese Supprimierung wurde ins Verhältnis zur maximalen Stimulation der Zellen durch LPS (1mg/ml) und IFN -  $\gamma$  (100IE/ml) gesetzt. Bei einer PAA – Konzentration von 1 mM zeigte sich eine signifikante Supprimierung auf 68 %, bei 5mM PAA eine signifikante Supprimierung auf 70% (N=6; P<0.05).

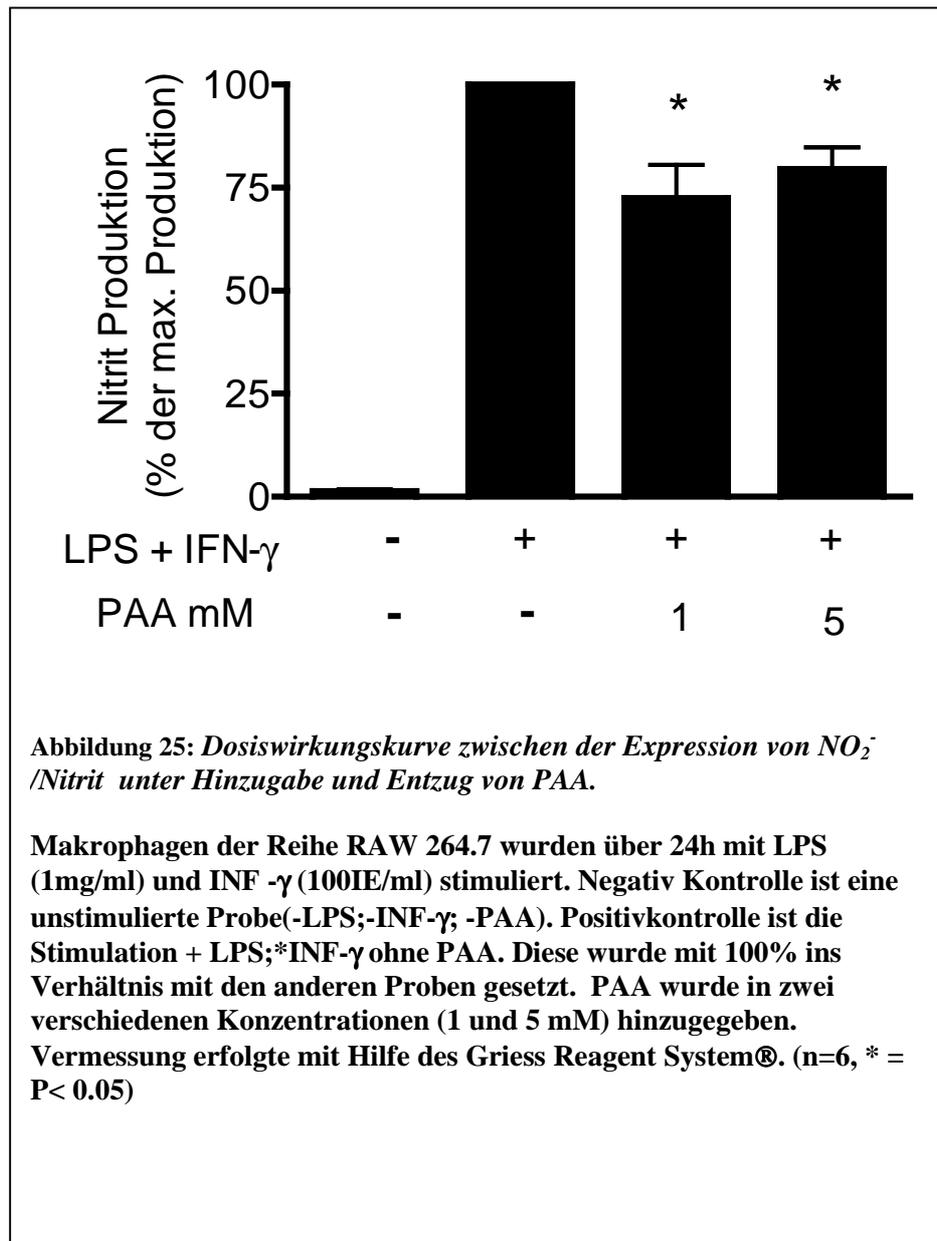
### 3.2.2 iNOS – Protein Expression unter der Einwirkung von PAA



Wir stimulierten Makrophagen der Reihe 264.7 mit LPS (1mg/ml) und INF - $\gamma$  (100IE/ml) unter Hinzugabe von PAA in verschiedenen Konzentrationen (1 mM und 5 mM). Nach 12stündiger Stimulation wurde das iNOS – Protein isoliert, durch Westernblott detektiert und densitometrisch quantifiziert. Die Stimulation unter Hinzugabe von LPS (Konzentration 1mg/ml) und INF - $\gamma$  (Konzentration 100 IE/ml) ohne PAA wurde mit 100% ins Verhältnis zu

den anderen Proben gesetzt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von iNOS Protein unter der Hinzugabe von PAA bei Konzentrationen von 1mM auf 59.8% und von 5mM auf 70,14% (n =6).

### 3.2.3 Nitrit – Expression unter Einwirkung von PAA



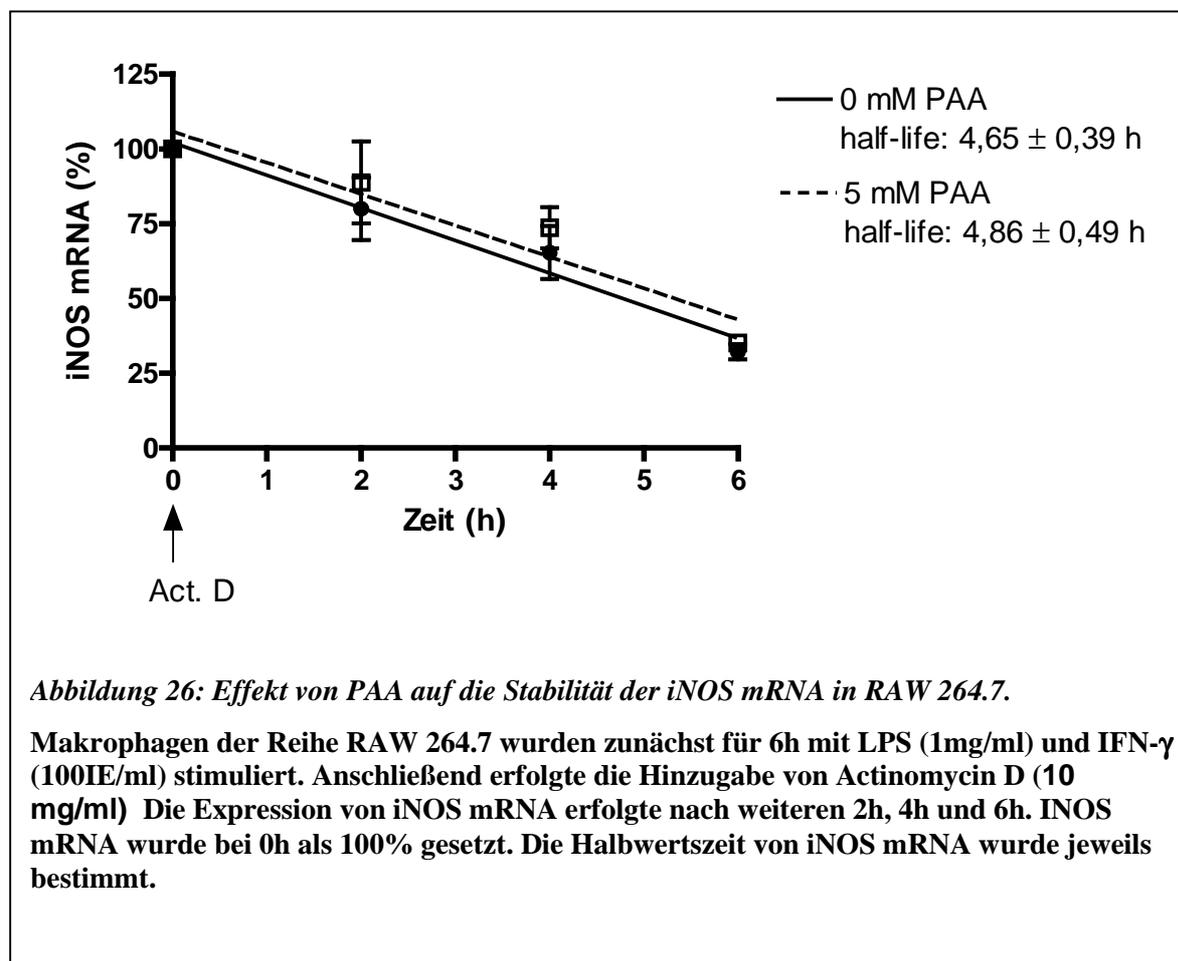
Makrophagen der Reihe 264.7 wurden über einen Zeitraum von 24h mit LPS (1mg/ml) und INF - $\gamma$  (100IE/ml) unter Hinzugabe und Entzug von PAA (1mM, 5mM) angeregt. Als stabiles

Abbauprodukt von PAA wurde Nitrit nach 24 Stunden aus dem Kulturmedium der stimulierten Zellen isoliert und mit Hilfe des Griess Reagent System<sup>®</sup> quantifiziert. Die mit LPS und IFN- $\gamma$  stimulierte Probe (ohne PAA) wurde mit 100% ins Verhältnis mit den anderen Proben gesetzt. Im Ergebnis zeigte sich eine signifikante Reduktion von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> bei PAA Konzentrationen von 1mM auf 72.4% und bei Konzentrationen von 5 mM auf 79.5 % (s. Abbildung 25).

### 3.2.4 iNOS mRNA Degradation unter PAA

Um den Einfluss von PAA auf die Degradation der iNOS mRNA zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit der iNOS mRNA unter Hinzugabe von Actinomycin D (Konzentration: 10 mg/ml) bestimmt.

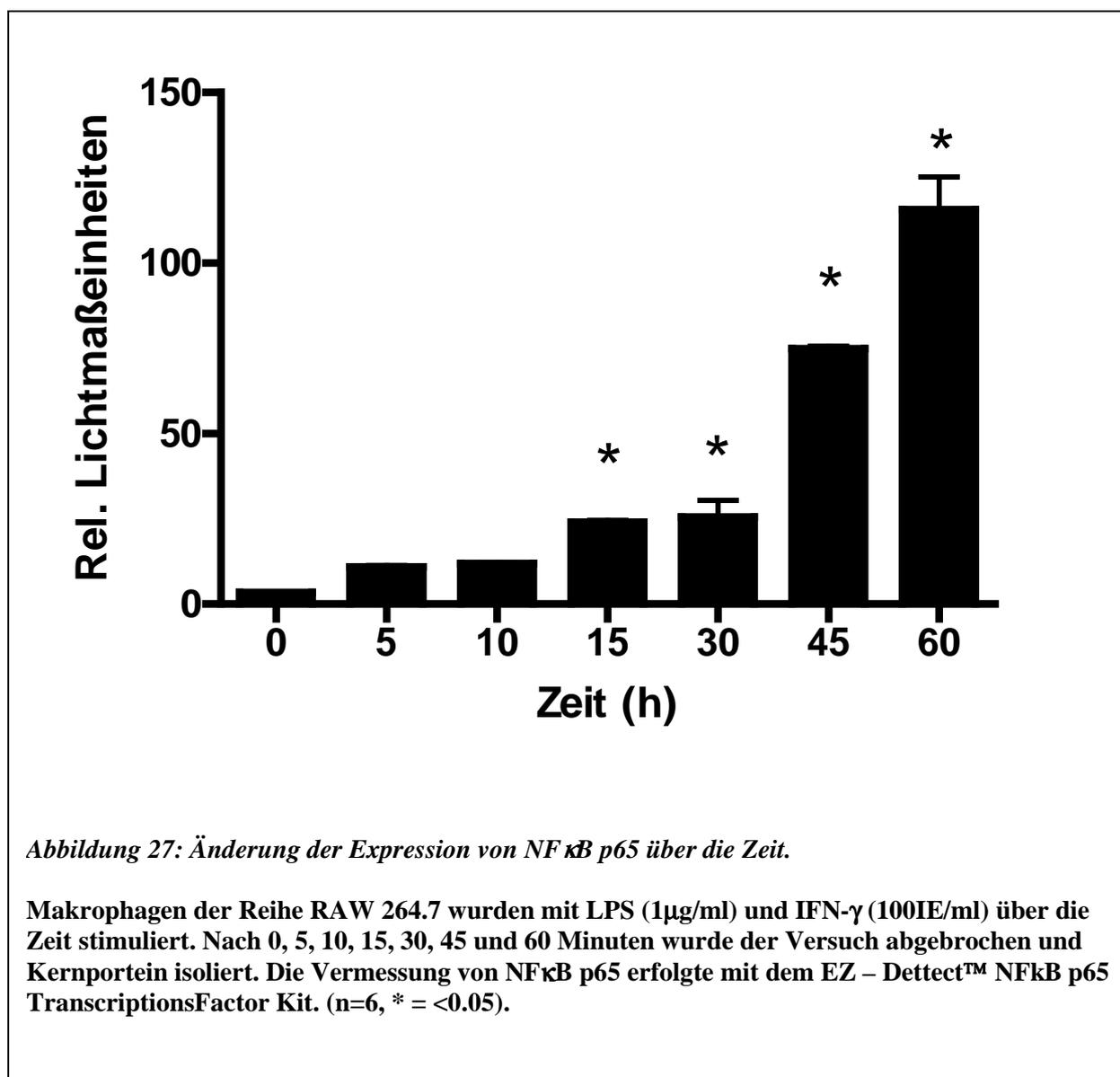
Makrophagen der Reihe RAW264.7 wurden mit LPS (1mg/ml) und IFN- $\gamma$  (100IE/ml) wurden zunächst für 6h stimuliert. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von Actinomycin D, um weitere Transkription zu verhindern. INOS mRNA Expression wurde zu verschiedenen



Zeitpunkten (2h, 4h und 6h) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit TaqMan real time PCR. Über die Abnahme der mRNA-Expression konnte die Halbwertszeit bestimmt werden. Ohne PAA zeigte sich eine Halbwertszeit der iNOS mRNA von  $4.65\text{h} \pm 0.39\text{h}$ . Unter Hinzugabe von 5mM PAA ergab sich eine Halbwertszeit der iNOS mRNA von  $4.86\text{h} \pm 0.49\text{h}$ . Zusammenfassend konnte kein signifikanter Einfluss von PAA auf die Halbwertszeit der iNOS mRNA gezeigt werden (s. Abbildung: 26).

### 3.3 Darstellung der Signaltransduktion von PAA

#### 3.3.1 Zeitpunkt der maximalen Aktivierung von NFκB



Wir stimulierten Makrophagen der Reihe RAW 264.7 mit LPS (1μg/ml) und IFN-γ (100IE/ml) über einen Zeitraum von 60 Minuten. Zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten) wurde der Versuch abgebrochen und nach dem im Methodenteil geschilderten Verfahren nukleäres Protein isoliert. Mit Hilfe des EZ – Dettect™ NFκB p65 TranscriptionsFactor Kit wurde dann NfκB p65 bestimmt. Es zeigte sich ein Anstieg der

NF $\kappa$ B p65 Konzentration über die Zeit, der nach 15 Minuten signifikant war. Nach 60 Minuten ergab sich ein Maximum mit 115,73 rel. Light Units. (s. Abbildung 27).

### 3.3.2 Effekt von PAA auf die Expression von NF $\kappa$ B

Makrophagen der Reihe RAW 264.7 wurden über 60 Minuten mit LPS (1 $\mu$ g/ml) und IFN $\gamma$

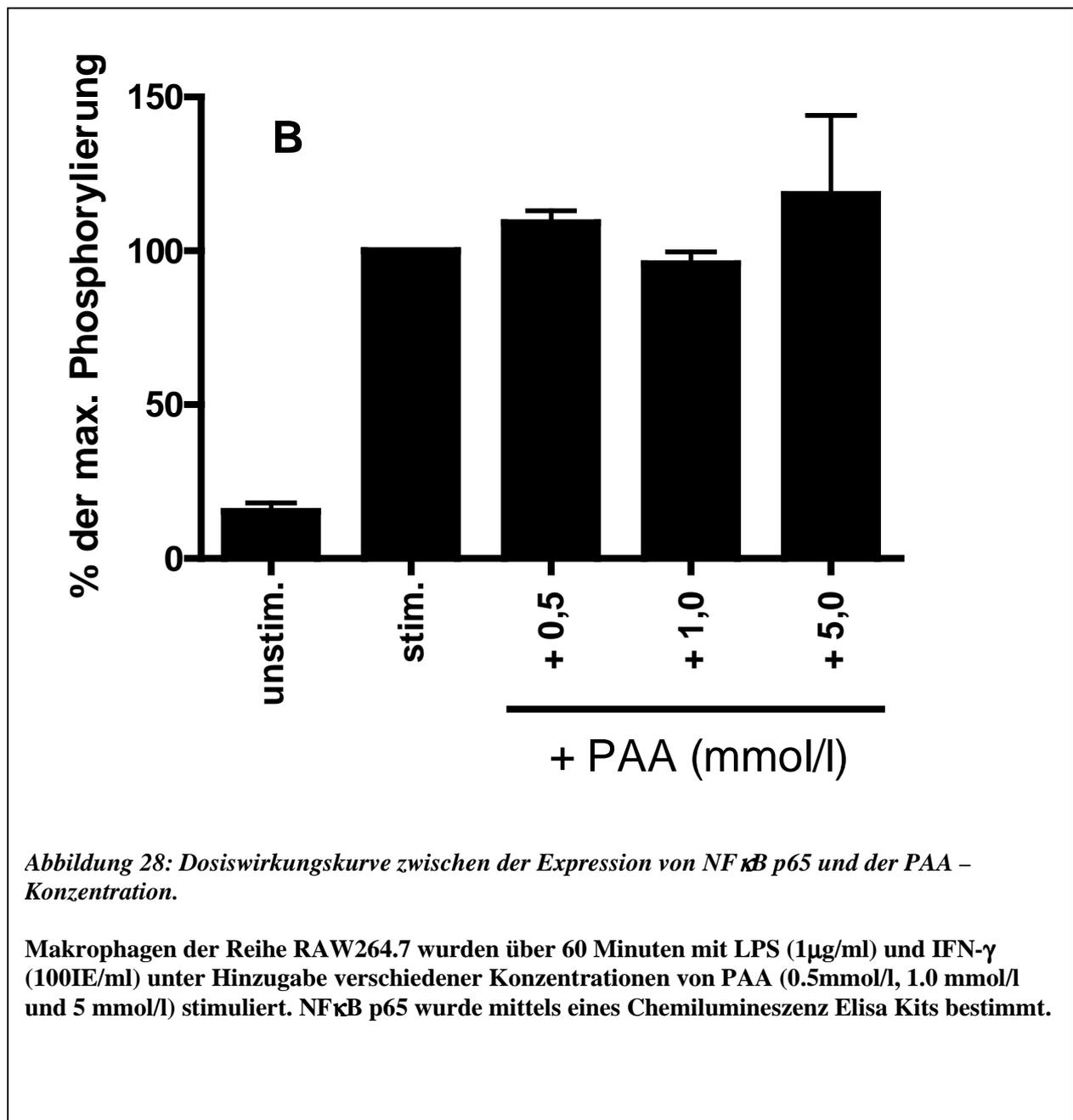


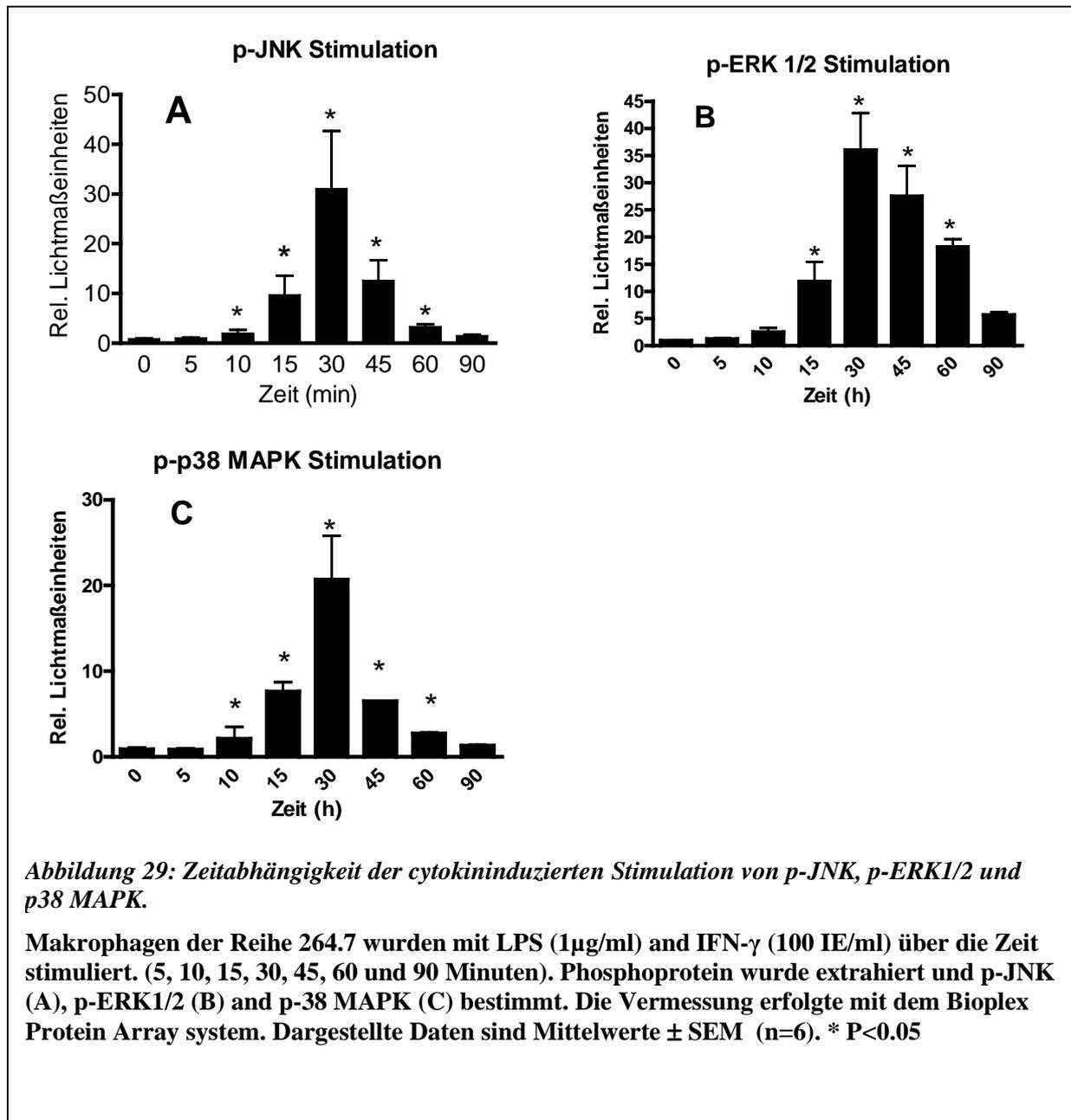
Abbildung 28: Dosiswirkungskurve zwischen der Expression von NF $\kappa$ B p65 und der PAA – Konzentration.

Makrophagen der Reihe RAW264.7 wurden über 60 Minuten mit LPS (1 $\mu$ g/ml) und IFN- $\gamma$  (100IE/ml) unter Hinzugabe verschiedener Konzentrationen von PAA (0.5mmol/l, 1.0 mmol/l und 5 mmol/l) stimuliert. NF $\kappa$ B p65 wurde mittels eines Chemilumineszenz Elisa Kits bestimmt.

(100IE/ml) stimuliert. Ferner wurden verschiedene Konzentrationen von PAA (0.5mmol/l, 1.0 mmol/l und 5mmol/l) hinzugegeben. Nach 60 Minuten wurde der Versuch abgebrochen und nukleäres Protein isoliert. NFκB wurde mit Hilfe des EZ – Detect™ NFκB p65 TranscriptionsFactor Kit quantifiziert. Die Proben, welche nur mit LPS (1μg/ml) und IFNγ (100IE/ml) stimuliert wurden, brachten wir zu den anderen als 100% ins Verhältnis. Bei einer PAA-Konzentration von 0.1 mmol/l ergab sich eine Konzentration von 109,2413 % (SEM± 3,87%), bei einer PAA – Konzentration von 5 mmol/l ein Wert von 118,32% (SEM= 25,69%). Es konnte kein signifikanter Einfluss von PAA auf die Konzentration von NFκB p65 im nukleären Protein gezeigt werden. (N=3)

### 3.3.3 Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung der MAP - Kinasen

Mit dem Bioplex Protein Array System bestimmten wir den Phosphorylierungsgrad der drei



wichtigsten MAP-Kinasen JNK, ERK1/2 und p38 MAPK. Wir stimulierten Makrophagen der Reihe RAW 264.7 über die Zeit mit LPS (1µg/ml) and IFN-γ (100 IE/ml). Nach 5, 10, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten wurden die Versuche abgebrochen, das Protein isoliert und der Phosphorylierungsgrad bestimmt. Hierbei zeigte sich bei p-JNK ein Stimulationsmaximum

nach 30 Minuten (31,09-fache Phosphorylierung vs. 0min; s. Abbildung 29 A). Für die MAP – Kinase p -ERK1/2 ergab sich ebenfalls ein Stimulationsmaximum nach 30 Minuten. Ein signifikanter Anstieg begann nach 15 Minuten. Der maximale Stimulationswert lag bei 36,0-facher Phosphorylierung vs. 0 min. (s. Abbildung 29 B). Für den Phosphorylierungsgrad der p38 MAPK ergab sich ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungsgrades nach einer Stimulation durch LPS (1µg/ml) and IFN-γ (100 IE/ml) nach 10 Minuten. Das Maximum der Phosphorylierung wurde nach 30 Minuten mit einem Wert von 20,71-facher Phosphorylierung vs. 0 min. erreicht (s. Abbildung 29 C).

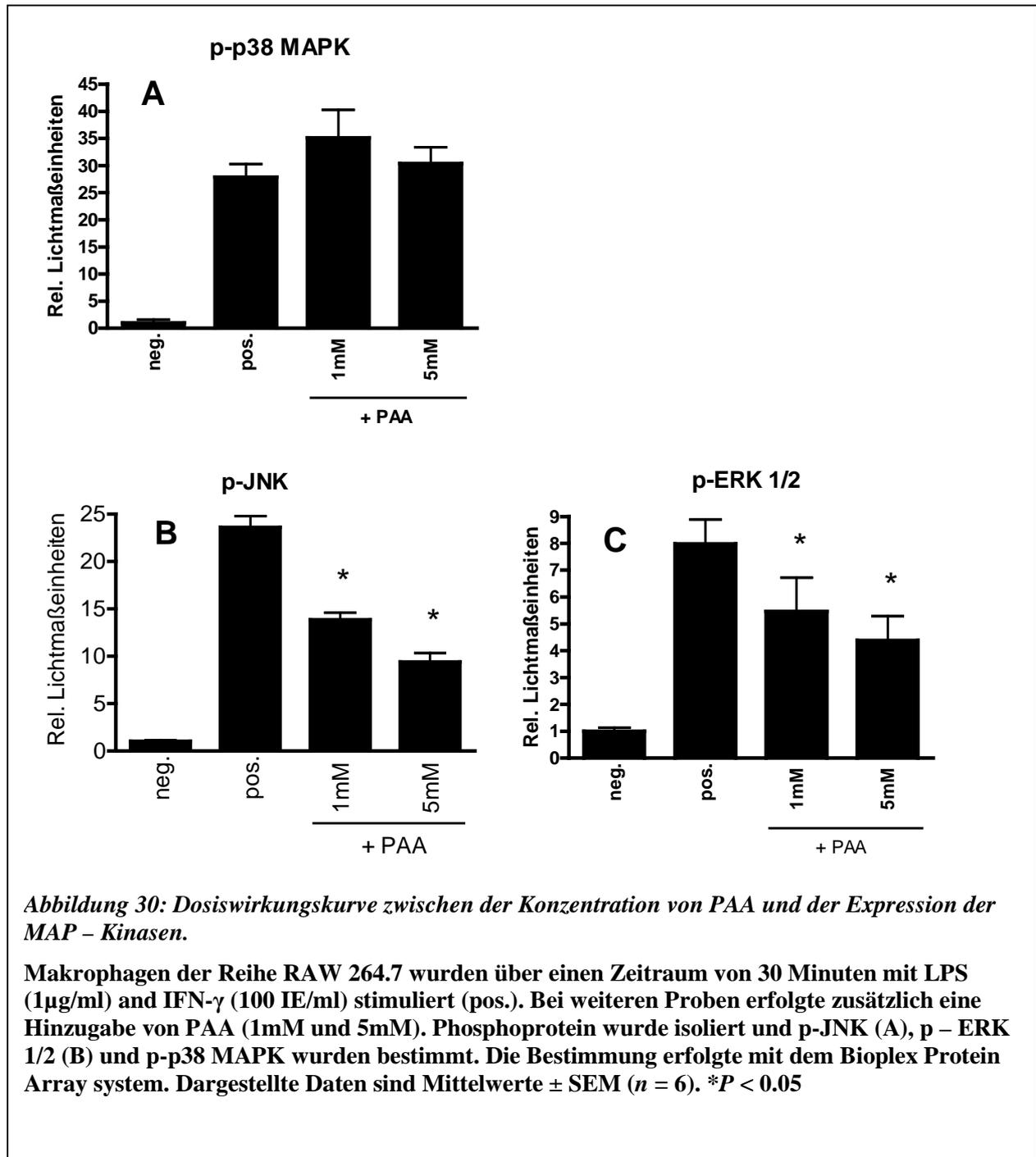
### **3.3.4 Einfluss von PAA auf die Phosphorylierung der MAP – Kinasen**

Mit dem Bioplex Protein Array System bestimmten wir die Aktivität/Phosphorylierung der drei wichtigsten MAP – Kinasen JNK, p38 MAPK und ERK 1/2. Makrophagen der Reihe 264.7 wurden mit LPS (1µg/ml) and IFN-γ (100 IE/ml) stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Hinzugabe von PAA in zwei verschiedenen Konzentrationen (1mM und 5mM). Nach 30 Minuten wurde der Versuch abgebrochen und Phosphoprotein isoliert.

Im Ergebnis konnte kein signifikanter Einfluss von PAA auf die Phosphorylierung von p38 MAPK nachgewiesen werden (s. Abbildung 30 A).

Im Gegensatz dazu zeigte der Phosphorylierungsgrad von JNK eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung unter Hinzugabe von PAA. Bei alleiniger Stimulation durch LPS (1µg/ml) and IFN-γ (100 IE/ml) zeigte sich eine 23,61-fache Phosphorylierung im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Unter Hinzugabe von PAA kam es zu einer signifikante Reduzierung der Phosphorylierung auf das 13,84-fache (1mM PAA) und 9,37-fache (5mM PAA; s. Abbildung 30B).

Auch der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 zeigte unter Hinzugabe von PAA eine stark signifikante Reduktion. Unter alleiniger Stimulation durch LPS (1µg/ml) and IFN-γ (100 IE/ml) ergab sich eine 7,97-fache Phosphorylierung im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Unter Hinzugabe von PAA zeigte sich bei einer Konzentration von 1 mM eine Phosphorylierung von 5,46-fach und bei einer PAA – Konzentration von 5 mM von 4,38-fach. Es lag bei beiden PAA - Konzentrationen Signifikanz vor (s. Abbildung 30 C).



## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, Erkenntnisse über das neue Urämietoxin Phenylacetessigsäure zu gewinnen. Schwerpunkt dabei ist die Suche nach einem Effekt von PAA auf iNOS in Makrophagen der Reihe RAW 264.7. Bisher war der Mechanismus der Inhibierung von iNOS ungeklärt und so war es die Absicht, in dieser Arbeit die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären und daraus Folgen einer verminderten NO – Produktion für einen einzelnen Makrophagen und infolgedessen auch im menschlichen Körper ableiten zu können..

Wie im Einleitungsteil dargestellt, bestehen für die Aktivierung der iNOS über den Effekt externer Stimuli wie zum Beispiel Cytokine, Wachstumsfaktoren und Stress zwei grundlegende Mechanismen.

Zum einen existiert die Möglichkeit der Signalübertragung von der Zellmembran zum Nucleus über NFκB und die damit einhergehende Translokation des p50/p65 Komplexes in den Zellkern.

Auf der anderen Seite steht der Mechanismus über die hierarchischen Strukturen der MAP – Kinasen, bei welchen es durch die Phosphorylierung der Hauptkinasen, ERK1/2, JNK und p38 MAPK, ebenfalls zu einer Translokation der genannten Enzyme in den Kern kommt. Die Aktivierung der Letztgenannten erfolgt über Phosphorylierung. ERK1/2 und JNK aktivieren die iNOS-Transskription, wohingegen die p38 MAPK hemmende Eigenschaften auf die iNOS-Transskription besitzt.

a) Zunächst sollte in einer ersten Versuchsreihe der Einfluss von PAA auf die iNOS Expression in Makrophagen der Zellreihe RAW 264.7 beschrieben werden. Hier wurde gezeigt, dass sowohl die Menge der mRNA, die Proteinmenge der iNOS und das Nitrit unter steigender Konzentration von PAA eine signifikante Reduktion erfährt.

b) In einem zweiten Schritt wurde versucht, den Angriffspunkt von PAA auf die Aktivierung von iNOS zu klären. Um eine mögliche Degradation der mRNA auszuschließen, wurde die Halbwertszeit der iNOS mRNA unter PAA bestimmt. In diesem Experiment konnte nun gezeigt werden dass die Halbwertszeit der iNOS mRNA nicht durch die Hinzugabe von PAA beeinflusst wird.

So ergab sich nun im Folgenden die Frage, in welchem Bereich der Angriffspunkt von PAA auf die iNOS Inhibition besteht.

Deshalb wurde der Einfluss von PAA auf die einzelnen Aktivierungskaskaden, NFκB und MAP-Kinasen, entsprechend der Signaltransduktion, untersucht.

Es zeigte sich in mehreren übereinstimmenden Testreihen, dass PAA nicht zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierung von NFκB führt. Folglich greift PAA nicht auf NFκB als einen Hauptsignaltransduktionsweg zurück.

Als Nächstes wurde der Einfluss von PAA auf die MAP-Kinase-Kaskade untersucht. Die drei wichtigsten Enzyme der MAP – Kinasen sind JNK, ERK1/2 und p38 MAPK. Mit der Benutzung des Bioplex – Systems war es möglich aus einer stimulierten Zellflasche sowohl die totale Proteinmenge von JNK, ERK1/2 und der p38 MAPK zu bestimmen, als auch die phosphorylierte, also die aktive Form zu quantifizieren.

So zeigten die Ergebnisse der Experimente, dass p38 MAPK unter dem Einfluss von PAA keine signifikante Änderung des Phosphorylierungsgrades und somit keine Änderung der Aktivität des Enzyms. ERK 1/2 , sowie JNK zeigten dagegen unter Anwesenheit von PAA eine signifikante Reduktion des Phosphorylierungsgrades.

In der Summe der Dinge kam es unter zunehmender Konzentration von PAA zu einer Reduktion der Phosphorylierung von JNK und ERK1/2 und als Folge dessen zu verminderten Aktivierung der Transkription von iNOS.

Vergleicht man die Ergebnisse mit früheren Arbeiten, so zeigen sich zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen der Regulation der iNOS im zentralen Nervensystem und in RAW – Zellen. So wird in einer Arbeit [*Pahan et al.; 1997*] in der Tat eine Reduktion der iNOS in Astrozyten einer Ratte durch Beeinflussung der NFκB – Kaskade. Potentielle Effekte von Phenylacetessigsäure auf die MAP – Kinasen sind nicht untersucht worden. Trotzdem sei an dieser Stelle festzuhalten, dass es in jedem Fall Unterschiede in der Second – Messenger Regulation der iNOS in den verschiedenen Geweben gibt. Ebenfalls wurde eine gewebstypische Aktivität der NADPH – Oxidase gezeigt. So beruht die Aktivierung der NADPH – Oxidase auf einer Reihe von membrangebundenen Kaskaden, die gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, rac und mox einschließen. Die gewebsspezifischen Eigenschaften dieses Enzyms in glatter Gefäßmuskulatur, Endothelzellen und Granulozyten sind eine Kombination der unterschiedlichen Verknüpfung der aufgezählten Untereinheiten (gp91phox, p22phox, p47phox.).

Unter Wiederaufgreifen der Ergebnisse dieser Arbeit, könnte in vergleichbarer Weise, die iNOS – Aktivierung über verschiedene gewebstypische Transduktionswege unterschiedlich moduliert sein. So werden weitere Untersuchungen nötig sein, um diese zu typisieren.

Stellt man nun anschließend die Frage nach der klinischen Relevanz dieser Ergebnisse, so eröffnet die Tatsache, dass Phenylacetessigsäure die Expression der induzierbaren NO – Synthase inhibiert, verschiedene Diskussionsfelder: Infektionen stehen - nach den kardiovaskulären Erkrankungen - an zweiter Stelle für Patienten mit einem chronischen Nierenversagen. Infektionen sind meistens hervorgerufen durch pathogene Elemente, die bei einem gesunden und immunkompetenten Menschen durch die Phagozytenfunktion im Blut und den verschiedenen Geweben begrenzt und unterbunden werden können. Die wichtigste Rolle spielt dabei die Phagozytenaktivität durch Monocyten und neutrophile Granulozyten. Patienten mit einem chronischen Nierenversagen zeigen gerade bei diesen beiden genannten Zellarten eine eingeschränkte Funktion. Wenig ist bisher über die Gründe des geminderten Potentials für die Abwehr bekannt.

In dieser Arbeit benutzten wir Zellen der Reihe RAW264.7, bei denen es sich um murine Peritonealmakrophagen handelt. Diese Zellreihe leitet sich von Monocyten ab und gehört somit zu den phagozytierenden Zellen. Monocyten sind phagozytierende Zellen, welche ROS (Reactive oxygen species) und RNS (Reactive nitrogen species) produzieren und freisetzen. Dieses erfolgt zum einen während der Phagozytose, zum anderen unter dem Einfluss verschiedener endogener und exogener Wirkstoffe. Die NADPH – Oxidase ist verantwortlich für die initiale Produktion von ROS. Sie wird auch „respiratory burst“ genannt. Es führt zu einer schnellen Verarbeitung und Zerstörung von Bakterien, Protozoen, Helminthen und Viren, sowie Tumorzellen, welche in Phagosomen aufgenommen wurden. Die Produktion von RNS wird durch iNOS hervorgerufen. RNS ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung einer starken bakteriostatischen Phase. Ein kombinierter Effekt dieser beiden Systeme (NADPH – Oxidase und iNOS) ist die Produktion von  $\text{ONOO}^-$  aus NO und  $\text{O}_2^-$ . Diese beiden Substanzen stellen die Basis des zytotoxischen Potentials für physiologische Makrophagen gegen Viren, Bakterien, Protozoen, Helminthen und Tumorzellen dar.

Ist nun die Produktion von iNOS durch PAA inhibiert, so fällt ein Hauptmechanismus in der Abwehr und Zerstörung von in Phagozyten aufgenommene Bakterien weg. Die Herstellung von RNS, sowie die Formierung von  $\text{ONOO}^-$  ist durch die mangelnde iNOS Aktivierung herabgesetzt.

Diesem Mechanismus könnte eine Rolle in der Abwehr und Eindämmung von bakteriellen Infektionen insbesondere von fakultativ intrazellulären Bakterien spielen. Es ist bekannt, dass Patienten mit einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz (CRF) eine erhöhte Mortalität bei Infektionen haben. Beispielsweise liegt die Inzidenz für eine Infektion durch

Mykobakterium Tuberculosis bei Dialysepatienten 16-fach höher als das der Normalbevölkerung. Diesem erhöhten Risiko einer Infektion durch Tuberkulose liegt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit vom Übergang der Infektion aus dem Latenzstadium in die aktivierte Form zugrunde. Ursächlich hierfür ist die gestörte zellvermittelte Immunität von CRF – Patienten.

Die Gründe hierfür sind noch weitgehend unbekannt. Expression von iNOS durch Makrophagen ist assoziiert mit der Th – 1 – Zell abhängigen Zerstörung intrazellulärer Mikroben (Bsp.: Kryptokokken, Toxoplasmose, Mykobakterien, Leishmanien). Als klassisches Beispiel einer TH1 – vermittelten Immunreaktion gilt Tuberkulose. In einem Experiment mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass NO eine essentielle Rolle beim Zerstörungsmechanismus von Mykobakterium Tuberculosis durch mononukleäre Makrophagen spielt. In einer Mausart mit genetisch zerstörter, nicht aktiver iNOS (iNOS<sup>-/-</sup>) war eine Infektion mit M. Tuberculosis assoziiert mit einem signifikant höheren Risiko der Ausbreitung der Infektion, sowie Mortalität im Vergleich zu den Mäusen ohne genetischen Defekt (wild type mice C57BL/6). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei einer Infektion mit Leishmanien und Klebsiellen gezeigt werden.

CRF – Patienten zeigen eine herabgesetzte Phagozytosekapazität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. In letzter Zeit konnten verschiedene Urämietoxine isoliert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass sie bei Urämiepatienten in Zusammenhang mit einer Dysfunktion von polymorphkernigen Leukozyten stehen (PMNLs). Als Beispiele seien hier "granulocyte inhibiting protein I (GIPI), granulocyte inhibiting protein II (GIPII), degranulation inhibiting protein I (DIPI), degranulation inhibiting protein II (DIGII), immunoglobulin light chain und chemotaxis inhibiting protein" zu nennen.

Zusätzlich zu der Bedeutung von iNOS bei der Phagozytose durch RNS und ONOO<sup>-</sup>, spielt iNOS eine bedeutende Rolle als Mediator in mehreren Pathways der Immunregulation von T – Zellen. So ist iNOS – generiertes NO verantwortlich für die funktionelle Ausreifung von "Natural Kill Cells" (NK – Zellen). Die zytotoxische Aktivität von NK – Zellen in iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen ist nicht messbar. Eine phänotypische Veränderung ist jedoch nicht nachweisbar. Die Inhibierung der iNOS durch PAA könnte also immunregulatorische Prozesse beeinflussen und könnte zusätzlich zu einer Zunahme des Immundefizits bei CRF Patienten führen.

## 5 Zusammenfassung

Infektionen gehören zu den häufigsten Todesursachen von chronisch niereninsuffizienten Patienten. Makrophagen bilden die erste Abwehrlinie des Menschen gegenüber Infektionen.

Bei chronisch niereninsuffizienten Patienten kommt es zu einer Funktionsstörung der Makrophagen. Eine wichtige Funktion der Makrophagen ist die Produktion von reactive nitrosative species (RNS) über iNOS. Zahlreiche Studien belegen, dass die Menge an RNS in Makrophagen mit der antimikrobiellen Wirkung gegenüber Mykobakterien korreliert.

In dieser Arbeit wurde das Urämietoxin PAA untersucht. Es sollte die Frage beantwortet werden, welchen Effekt PAA auf die Expression der iNOS in Makrophagen der Zellreihe RAW264.7 hat. Dabei konnte sowohl auf der Ebene der mRNA, als auch im Bereich von Protein und Produkt (Nitrit) gezeigt werden, dass Phenylacetessigsäure zu einer signifikanten, dosisabhängigen Reduktion der iNOS-Aktivierung führt. Weiterhin sollte der Angriffspunkt von PAA in der Signaltransduktion von iNOS aufgedeckt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der iNOS-Transkription über die MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK durch PAA signifikant und dosisabhängig gehemmt wird. Die Aktivierung der dritten MAP-Kinase p38 MAPK bleibt von PAA unbeeinflusst. Auch die Aktivierung von iNOS über NF- $\kappa$ B wird von PAA nicht beeinträchtigt. Ein Einfluss von PAA auf die Halbwertszeit der iNOS-mRNA wurde ausgeschlossen.

Da die RNS Produktion über iNOS ein Hauptabwehrmechanismus von Makrophagen gegenüber Pathogenen ist, könnte eine durch das Urämietoxin PAA vermittelte Hemmung der iNOS Aktivierung zu der Immundefizienz von chronisch niereninsuffizienten Patienten beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adams LB, D.M., Morgenstern DE, Krahenbuhl JL, *Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice*. *Tuber Lung Dis.*, 1997. 78(5-6):: p. 237-46.
2. Bogdan C, R.M., Diefenbach A-, *The role of nitric oxide in innate immunity*. *Immunol Rev.*, 2000. 173(17-26).
3. Chan J, T.K., Carroll D, Flynn J, Bloom BR, *Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.*, 1995. 63(2):: p. 736-40.
4. Chan J, X.Y., Magliozzo RS, Bloom BR, *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. *J Exp Med.*, 1992. 175(4): p. 1111-22.
5. Cheung AK, S.M., Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS, *Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients*. *Kidney Int.*, 2000. 58(1):(-): p. 353-62.
6. Classen, Diehl, Koch, Kochsiek, Pongratz, *Differentialdiagnostik Innere Medizin*, 1998, Urban & Schwarzenberg
7. Cohen G, H.-W.M., Mai B, Deicher R, Horl WH, *Effect of immunoglobulin light chains from hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients on polymorphonuclear leukocyte functions*. *J Am Soc Nephrol.*, 1995. 6(6):(-): p. 1592-9.
8. Cohen G, R.M., Horl WH, *Isolation of modified ubiquitin as a neutrophil chemotaxis inhibitor from uremic patients*. *J Am Soc Nephrol.*, 1998. 9(3):(-): p. 451-6.
9. Cohen G, R.M., Horl WH, *Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils*. *Kidney Int Suppl.*, 2001. 78(-): p. S48-52.
10. Cohen G, R.M., Horl WH, *Immunoglobulin light chains modulate polymorphonuclear leucocyte apoptosis*. *Eur J Clin Invest.*, 2003. 33(8):(-): p. 669-76.
11. Cornwell TL, A.E., Boerth NJ, Lincoln TM, *Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP*. *Am J Physiol*, 1994. 267: p. C1405 - 1413.

12. Cornwell TL, A.E., Boerth NJ, Lincoln TM., *Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP*. Am J Physiol., 1994. 267(5 Pt 1):(-): p. C1405-13.
13. De Caterina R, L.P., Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK, *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. 96: p. 60-68.
14. Diefenbach A, S.H., Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Rollinghoff M, Gresser I, Bogdan C, *Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite*. Immunity., 1998. 8(1): p. 77-87.
15. Dietel M, Suttrop N., Zeitz M, Tinsley R. Harrison, *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage, Mai 2005
16. Forman HJ, F.J., Torres M., *Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers*. Am J Physiol Cell Physiol., 2004. ;287(2)(-): p. C246-56.
17. van der Giet M, P.M., *New tendencies in combination antihypertensive therapy*. MMW Fortschr Med, 2005. 147(46):44-6.
18. Griendling KK, S.D., Ushio-Fukai M, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res., 2000. 86(5):(-): p. 494-501.
19. Gross, Schölmerich, Gerok; *Die Innere Medizin*, 9. Auflage; 1996; Schattauer
20. Horl WH, H.-W.M., Georgopoulos A, Block LH, *Physicochemical characterization of a polypeptide present in uremic serum that inhibits the biological activity of polymorphonuclear cells*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1990. 87(-): p. 6353-7.
21. Jankowski, M. van der Giet, V. Jankowski, S. Schmidt, M. Hemeier, B. Mahn, G. Giebing, M. Tölle, H. Luftmann, H. Schlüter, W. Zidek and M. Tepel 2003.: *Increased plasma phenylacetic in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression*. J. Clin. Invest. 112: 256 – 264
22. Karin M, D.M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem., 1995. 270(28):: p. 16483-6.
23. Karin M, D.M., *Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses*. Ann N Y Acad Sci., 1998. 851(-): p. 139-46.

24. Karin M, D.M., *The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling*. Semin Immunol., 2000. 12(1)(-): p. 85-98.
25. Katsuyama K, S.M., Marumo F, Hirata Y, *NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1998. 18(11)(-): p. 1796-802.
26. Khan IH, C.G., *Long-term complications of dialysis: infection*. Kidney Int Suppl., 1993. 41(-): p. S143-8.
27. Löffler, Petrides; *Biochemie und Pathobiochemie*; 6. Auflage; 1998; Springer - Verlag
28. MacMicking J, X.Q., Nathan C, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol., 1997Nitric oxide and macrophage function. 15(-): p. 323-50.
29. MacMicking JD, N.R., LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF, *Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1997. 94(10):: p. 5243-8.
30. Markus Tölle\*, B.L., Petra Keul, Volker Brinkmann, Günter Giebing, Gilbert Schönfelder, Michael Schäfers, Karin von Wnuck Lipinski, Joachim Jankowski, Vera Jankowski, Jerold Chun, Walter Zidek, Markus Van der Giet, *Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-Dependent Arterial Vasodilatation via the Lysophospholipid Receptor SIP3*. Circulation Research, 2005. 96:913.)(-): p. -.
31. Minnaganti VR, C.B., *Infections associated with uremia and dialysis*. Infect Dis Clin North Am., 2001. 15(2)(-): p. 385-406.
32. Muniz-Junqueira MI, B.L.C., Magalhaes CA, Schleicher CC, Veiga JP, *Acute and chronic influence of hemodialysis according to the membrane used on phagocytic function of neutrophils and monocytes and pro-inflammatory cytokines production in chronic renal failure patients*. Life Sci., 2005. 77(25)(-): p. 3141-55.
33. Oberdoerster J, G.M., Costa LG, *Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria*. J Pharmacol Exp Ther., 2000. 295(1)(-): p. 295-301.
34. Pahan K, S.F., Namboodiri AM, Singh I, *Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages*. 1997. 100(-): p. 2671-2679.
35. Riede, Schaefer; *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4. Auflage; 1995, Thieme Verlag

36. Salvucci O, K.J., Dugas B, Dugas N, Chouaib S, *The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity.* Blood., 1998. 92(6):: p. 2093-102.
37. Schönweiss, *Dialysefibel*, 2. Auflage, 1998, Abakiss
38. Tsai WC, S.R., Zisman DA, Wilkowski JM, Bucknell KA, Chen GH, Standiford TJ, *Nitric oxide is required for effective innate immunity against Klebsiella pneumoniae.* Infect Immun., 1997. 65(5):: p. 1870-5.
39. Tschesche H, K.C., Horl WH, Hempelmann U, *Inhibition of degranulation of polymorphonuclear leukocytes by angiogenin and its tryptic fragment.* J Biol Chem., 1994. 269(48)(-): p. 30274-80.
40. USRDS – Annual Data Report 1997
41. Vanholder, *Uremic toxins*, Nephrologie, 2003. 24(7):p. 373-6.
42. Westhoff TH, S.-H.H., Schmidt S, Tolle M, Zidek W, van der Giet M, *Convenience of ambulatory blood pressure monitoring: comparison of different devices.* Blood Press Monit, 2005. 10(5):239-42.(-): p. -.
43. WH., H., *Neutrophil function and infections in uremia.* Am J Kidney Dis., 1999. 33(2):(-): p. xlv-xlvi.
44. Yu K, M.C., Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, Chan J., *Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: M. tuberculosis is resistant to peroxynitrite anion.* Tuber Lung Dis., 1999. 79(4):: p. 191-8.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>AP</b>	<b>Aktivierungsprotein</b>
<b>APS</b>	<b>Ammonium persulfat</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>Destilliertes Wasser</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonucleinsäure</b>
<b>DTT</b>	<b>Dithiothreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>
<b>eNOS</b>	<b>Endotheliale NO - Synthetase</b>
<b>ERK</b>	<b>Extracellular-signal Regulated Kinasen</b>
<b>FCS</b>	<b>Fötale Kälberserum</b>
<b>FκB</b>	<b>Freies κ - B</b>
<b>HCL</b>	<b>Chlorwasserstoff</b>
<b>IgG</b>	<b>Immunglobulin G</b>
<b>IκB</b>	<b>Inhibitorisches - κB</b>
<b>iNOS</b>	<b>Induzierbare NO - Synthase</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>INF</b>	<b>Interferon</b>
<b>JNK</b>	<b>c-Jun N-terminale Kinasen</b>
<b>KCl</b>	<b>Kaliumchlorid</b>
<b>KHK</b>	<b>Koronare Herzerkrankung</b>
<b>KOH</b>	<b>Kaliumhydroxid</b>
<b>λ</b>	<b>Lambda = Einheit der Wellenlänge</b>
<b>Lit.</b>	<b>Literatur</b>
<b>MAP- Kinasen</b>	<b>Mitogen aktivierte Proteinkinase</b>
<b>mRNA</b>	<b>messenger-RNA</b>
<b>NaCl</b>	<b>Natriumchlorid</b>
<b>NED</b>	<b>NED</b>
<b>NO<sub>2</sub></b>	<b>Nitrit</b>
<b>PAA</b>	<b>Phenylacetessigsäure</b>
<b>pAVK</b>	<b>Periphere arterielle Verschlusskrankheit</b>

<b>PBS</b>	<b>phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase – chain - reaction</b>
<b>Phox</b>	<b>Phagozytenoxidase</b>
<b>RAW 264.7</b>	<b>(Abelson murine leukemia virus-induced tumor)</b>
<b>RNA / RNS</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>RPMI</b>	<b>Roswell Park Memorial Institute</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactiv oxygen species</b>
<b>SDS</b>	<b>Natriumlaurylsulfat / Sodium Dodecyl Sulfate</b>
<b>SOD</b>	<b>Superoxiddismutase</b>
<b>TBS</b>	<b>Tris-buffered saline (Tris-HCl-Pufferlösung)</b>
<b>TNF</b>	<b>Tumor Nekrose Faktor</b>
<b>vs</b>	<b>versus</b>

## 8 Abbildungsverzeichnis

### Abbildung Titel

- Abb. 1 Todesursachen bei ERDS (end-stage renal disease)
- Abb. 2 Ätiologie der chronischen Niereninsuffizienz
- Abb. 3 Stadieneinteilung des chronischen Nierenversagen
- Abb. 4 Schematische Darstellung der Hämodialyse
- Abb. 5 Phenylacetessigsäure (Strukturformel)
- Abb. 6 Der Effekt von iNOS und Phagocyten NAPDH Oxidase auf die antimikrobielle Aktivität von Makrophgen C57 BL/6 auf Salmonella typhimurium Stämme über die Zeit.
- Abb. 7 Schematische Darstellung des iNOS Signaltransduktion über NFκB
- Abb. 8 Schematische Darstellung der iNOS Signaltransduktion über die membranständige MAP – Kinase
- Abb. 9 Fluoreszenzmirkoskopische Darstellung von RAW 264.7
- Abb. 10 Schematische Darstellung eines Einzelstranges mit angelagerten Primer und cDNA – Sonde
- Abb. 11 Freiwerden des Fluoreszenzfarbstoffes (F) durch Hydrolysierung der Sonde durch die Taq – Polymerase
- Abb. 12 Räumliche Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher, mit schematischer Darstellung des Lichtsignals
- Abb. 13 Schematische Darstellung des ABI PRISM 7700 Detection System
- Abb. 14 Strukturformel Actinomycin D
- Abb. 15 Schematische Darstellung der Anordnung von Filterpapaier, SDS – Gel und Nitrocellulosemembran zum Blotten der getrennten Proteinfractionen
- Abb. 16 Schematische Darstellung der Funktionsweise des EZ – Dettect™ NFκB p65 TranscriptionsFactor Kit
- Abb. 17 Darstellung des Reaktionsmechnismus von Nitrit über das Zwischenprodukt NED zu einer Azoverbindung
- Abb. 18 Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes von NED und Sufanilamid

- Abb. 19 Schematische Darstellung des Bio-Plex Phosphoprotein Assay<sup>®</sup> System
- Abb. 20 Darstellung der maximalen NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/Nitrit Expression.
- Abb. 21 Darstellung der maximalen iNOS mRNA Expression.
- Abb. 22 Darstellung der maximalen iNOS – Protein Expression.
- Abb. 23 Dosiswirkungskurve zwischen der Expression von iNOS mRNA unter Hinzugabe und Entzug von PAA.
- Abb. 24 Dosiswirkungskurve zwischen der Expression von iNOS mRNA unter Hinzugabe und Entzug von PAA.
- Abb. 25 Dosiswirkungskurve zwischen der Expression von NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/Nitrit unter Hinzugabe und Entzug von PAA.
- Abb. 26 Effekt von PAA auf die Stabilität der iNOS mRNA in RAW 264.7.
- Abb. 27 Änderung der Expression von NFκB p65 über die Zeit.
- Abb. 28 Dosiswirkungskurve zwischen der Expression von NFκB und der PAA – Konzentration.
- Abb. 29 Zeitabhängigkeit der cytokininduzierten Stimulation von p-JNK, p-ERK1/2 und p38 MAPK.
- Abb. 30 Dosiswirkungskurve zwischen der Konzentration von PAA und der Expression der MAP – Kinasen.

**Tabelle Titel**

- Tab. 1 Liste der mit dem Bio-Plex Phosphoprotein Assay<sup>®</sup> bestimmbaren Proteine

## **9 Curriculum vitae**

In der elektronischen Version dieser Dissertation wird der Lebenslauf aus Datenschutzgründen nicht mit veröffentlicht.

## **10 Danksagung**

Ich möchte mich für das Entstehen dieser Arbeit ganz recht herzlich bei folgenden Personen bedanken:

Herrn Prof. Dr. med. Van der Giet  
Herrn Prof. Dr. med. Walter Zidek  
Herrn Dr. med. Sven Schmidt und seiner Frau  
Herrn Dr. med. Tim Westhoff  
Frau Ina – Sabine Nelly Köhler  
Der gesamten Laborcrew

Meinen Eltern Nora und Jürgen  
Meinen Geschwistern Asja, Miriam und Jasper  
Meiner Ehefrau Varinia.

Alle haben auf Ihre ganz bestimmte Weise für das Entstehen und schließlich die Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

## 11. Erklärung

„Ich, Philipp Tibor Krauser (geb. 05.10.1979), erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Effekt des Urämietoxin Phenylacetessigsäure (PAA) auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift