

**Modulation des L-Argininstoffwechsels von humanen dermalen  
mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl.-Biol. Ramona Körting

geboren am 30.07.1974 in Schwerin

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. W. Wohlrab (Halle)
2. Prof. Dr. rer. nat. R. Neubert (Halle)
3. Prof. Dr. med. M. Sticherling (Leipzig)

Halle (Saale), den 21.08.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000004038**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004038>]

In Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

<b>1 Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>4</b>
2.1 Das humane dermale mikrohämovaskuläre System	4
2.2 Biochemische und physiologische Eigenschaften von L-Arginin	6
2.3 NO-Synthasen	7
2.4 Stickstoffmonoxid	10
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1 Chemikalien und Lösungen	14
3.2 Geräte und Hilfsmittel	17
3.3 Isolierung und Kultivierung humaner dermaler mikrohämovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)	20
3.3.1 Isolierung von HDMEC	20
3.3.2 Subkultivierung und Passagierung von HDMEC	23
3.4 Charakterisierung von HDMEC	24
3.4.1 Flowzytometrische Bestimmung des von Willebrand Faktors	24
3.4.2 Mycoplasmentest	25
3.4.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von HDMEC	25
3.5 Inkubationsschemata von potentiell NO-Synthase-modulierenden Substanzen	26
3.6 Bestimmung des Proliferationsverhaltens	27
3.7 Untersuchungen zur Beeinflussung des L-Arginin/NO-Metabolismus in HDMEC	27
3.7.1 Bestimmung des Nitrit-Gehaltes nach Griess	28
3.7.2 Analyse der Proteinexpression der NO-Synthasen mittels Westernblot-Analyse	28
3.7.2.1 Zellaufschluß	29
3.7.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry	29
3.7.2.3 Westernblot	30
3.7.3 Analyse der mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR	31
3.7.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA	31
3.7.3.2 cDNA-Synthese	32

3.7.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.7.3.4	Agarosegel-Elektrophorese	35
3.7.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.7.5	DNA-Sequenzierung	36
3.8	Statistische Auswertung	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1	Charakterisierung der isolierten HDMEC	38
4.1.1	Zellausbeute und Reinheit der isolierten HDMEC	38
4.1.2	FACS-Analyse des von Willebrand Faktors	41
4.1.3	Nachweis der Mycoplasmenfreiheit	45
4.1.4	Wachstumsverhalten der isolierten HDMEC	45
4.1.5	Bewertung der HDMEC-Isolation	47
4.2	Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Substanzen auf den L-Arginin/NO-Stoffwechsel in HDMEC	51
4.2.1	Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die Vitalität	51
4.2.1.1	Einfluß von L-Arginin	52
4.2.1.2	Einfluß von Ca <sup>2+</sup> -Ionen	54
4.2.1.3	Einfluß von Tetrahydrobiopterin	55
4.2.1.4	Einfluß von L-Ornithin	56
4.2.1.5	Einfluß von L-Lysin	57
4.2.1.6	Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Arginin	58
4.2.1.7	Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Leucin	59
4.2.2	NO-Freisetzung in HDMEC	60
4.2.2.1	Einfluß von L-Arginin	61
4.2.2.2	Einfluß von Ca <sup>2+</sup> -Ionen	62
4.2.2.3	Einfluß von Tetrahydrobiopterin	63
4.2.2.4	Einfluß von L-Ornithin	64
4.2.2.5	Einfluß von L-Lysin	66
4.2.2.6	Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Arginin	67
4.2.2.7	Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Leucin	68
4.2.3	Einfluß von L-Arginin auf die Proteinexpression der NOS	69
4.2.4	Einfluß von L-Arginin auf die mRNA-Expression der NOS	70
4.2.5	Sequenzanalyse der amplifizierten PCR-Produkte	73
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
5.1	L-Arginin	74
5.2	Ca <sup>2+</sup> -Ionen	77
5.3	Tetrahydrobiopterin	78

5.4 L-Ornithin und L-Lysin	82
5.5 L-Arginyl-L-Arginin und L-Arginyl-L-Leucin	84
5.6 eNOS- und iNOS-Expression	86
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>92</b>

Literaturverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata (bidestiliertes Wasser)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	Chorio Allantois Membran
CaM	Calmodulin
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
dpm	desintegration per minute
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGM	endothelial cell growth medium
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
fwd	foward
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
HBSS	Hank's Balanced Salt
hCAT	human cationic amino acid transporter
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HET	hen's egg test
hEGF	human epidermal growth factor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
L-Arg	L-Arginin
L-Arg-Arg	L-Arginyl-L-Arginin
L-Arg-Leu	L-Arginyl-L-Leucin
L-Lys	L-Lysin
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-methylester
L-NIO	N <sup>G</sup> -Iminoethyl-L-Ornithin

L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
L-Orn	L-Ornithin
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliamper
min	Minute
Mio	Million
MPC	Magnetic Particle Concentrator
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase cNOS (constitute NOS) eNOS ( endothelial NOS) iNOS (inducible NOS) nNOS (neuronal NOS)
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
rev	reversed
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
T <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
vWF	von Willebrand Faktor

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Mikrovaskuläre Endothelzellen bilden die Kontaktfläche zwischen zirkulierendem Blut und umgebendem Gewebe. Sie stellen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wesentliche Komponente dar. So erfolgt die Initiation und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen unter Beteiligung des Mikrogefäßsystems (Swerlick et al., 1991; Detmar et al., 1992; Swerlick and Lawley, 1993; Gille et al., 1997; Hoffmann et al., 1999; Binion et al., 2000; Hoffmann et al., 2001). Einer der wohl bedeutendsten Regulationsfaktoren der lymphovaskulären Perfusion stellt neben der vegetativen Innervation das Gas Stickstoffmonoxid (NO) dar. Dabei spielt die Modulation des mikrovaskulären Tonus und der vaskulären Permeabilität sowie die daraus resultierende Vasodilatation eine entscheidende Rolle (Kubes, 1995; Clough, 1999).

Im Hautorgan unterliegt die kutane Mikrozirkulation einer streng NO-vermittelten Regulation unter Wirkung vasokonstriktiver und vasodilatativer Signale (Brovkovych et al., 1999; Figueroa et al., 2001). Stickstoffmonoxid agiert dabei als ein autokriner und parakriner Mediator bei der intra- und interzellulären Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellsystemen in der Haut (Sirsjö et al., 1996; Bruch-Gerharz et al., 1998; Kellogg et al., 1999). Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften (kleines, gasförmiges Radikal) ist NO sowohl in regulatorische (z.B. Superoxid-Radikalfänger, Aktivierung der Guanylatzyklase, Inaktivierung eingedrungener Pathogene etc.) als auch in zytotoxische (z.B. Peroxynitritbildung, Zerstörung von Zink-Schwefel-Cluster, Inaktivierung von Eisen-enthaltenden Enzymen, Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase etc.) Mechanismen involviert (Bruch-Gerharz et al., 1998).

Die Generierung dieses multifunktionalen Signalmoleküls erfolgt über die NO-Synthase-katalysierte Umsetzung von L-Arginin, wobei als zweites Reaktionsprodukt L-Citrullin entsteht. Innerhalb der NO-Synthasen (NOS) werden drei Isotypen unterschieden, die in der zell- und gewebespezifischen Regulation der Aktivität und der Expression differieren. Die endotheliale (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS), die konstitutiv exprimiert werden und geringe Mengen an NO freisetzen, stehen dem induzierbaren Isoenzym (iNOS) gegenüber, welches nach Stimulation mit Zytokinen (z.B. IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) oder Neuropeptide induziert werden kann und für eine Produktion hoher NO-Mengen

verantwortlich ist (Fukumoto et al., 1997; Bruch-Gerharz et al., 1998; Ormerod et al., 1998; Hoffmann et al., 1999; Ahmed and van den Oord, 2000; Lee et al., 2000a).

Zu Störungen und Dysfunktionen der L-Arginin-vermittelten NO-Generierung, die das Hautorgan betreffen, zählen unter anderem die Psoriasis (Schuppenflechte), bei der eine verstärkte Expression der NO-Synthase auftritt sowie die atopische Dermatitis, die Kontaktdermatitis und der Lupus erythematodes. Der eingeschränkte Mechanismus der Vasodilatation beim Raynaud's-Phänomen, bei dem spasmenartige Überreaktionen der Hautgefäße Durchblutungsstörungen verursachen, ist auf eine verminderte Arginin-vermittelte NO-Generierung zurückzuführen (Khan et al., 1997). Die UVB-induzierte Erythembildung basiert auf eine erhöhte NO-Produktion (Villiotou and Deliconstantinos, 1995; Bunker et al., 1996; Romero-Graillet et al., 1996; Ormerod et al., 1998, Stallmeyer et al., 1999; Weller, 1999; Ormerod et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Kagoura et al., 2001).

Um pathologischen Zuständen entgegenzuwirken, in denen eine Störung des L-Arginin/NO-Metabolismus im Hautgewebe zu Grunde liegen, wurden bereits Therapiestrategien entwickelt, bei denen die NO-Produktion durch Stimulatoren sowie Inhibitoren der Aktivität und der Expression bzw. durch NO-Donoren und NO-Fänger moduliert wurde (Goldsmith et al., 1996; Bruch-Gerharz et al., 1998). Der Einsatz solcher Wirkstoffe erfolgte lokal durch intradermale (Bull et al., 1996, Goldsmith et al., 1996; Noon et al., 1996; Kellogg et al., 1999; Wallengren and Larsson, 2001) oder intraarterielle (Coffman, 1994; Kellogg et al., 1998; Shastry et al., 2000) Injektion, topisch (Örem et al., 1997; Ormerod et al., 2000; Figueroa et al., 2001), systemisch (Uemura et al., 2000) oder oral (Khan et al., 1997; Frank et al., 1998; Frank et al., 1999; Shi et al., 2000).

Zielstellung der Arbeit:

Hinsichtlich der Zellmorphologie und der Immunhistologie ist eine differente Betrachtung von Makro- und Mikrogefäßsystem notwendig. Dies trifft ebenfalls auf eine Vielzahl von Regulationsmechanismen diverser Funktionsabläufe innerhalb des Gefäßsystems zu.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zum L-Argininstoffwechsel in humanen mikrovaskulären Gefäßzellen. Dabei soll geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß eine Modulation der L-Arginin-vermittelten NO-Generierung festzustellen ist. Es sollen Substanzen in der Zellkultur von HDMEC getestet werden, die in die verschiedenen Phasen des L-Argininstoffwechsels eingreifen, woraus sich folgende Fragen für die Dissertationsarbeit ableiten:

1. Führt eine Erhöhung der extrazellulären L-Argininkonzentration zu einer gesteigerten NO-Freisetzung?
2. Wie gestaltet sich das toxische Potential dieser Aminosäure in einem Konzentrations-Zeit-Profil?
3. Tritt nach Applikation von höheren L-Argininkonzentrationen eine Änderung des Expressionsmusters der endothelialen und der induzierbaren NOS auf?
4. Kann die Suppletierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und des Cofaktors Tetrahydrobiopterin die NOS-vermittelte NO-Generierung steigern?
5. Bewirken die um das  $\gamma^+$ -Transportsystem konkurrierenden kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin eine Verringerung der NO-Produktion?
6. Welchen Effekt hat dabei die simultane Applikation von L-Arginin?
7. Wird durch Zugabe L-Arginin-haltiger Dipeptide die NOS-Aktivität und damit die NO-Freisetzung beeinflusst?

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Das humane dermale mikrohämovaskuläre System

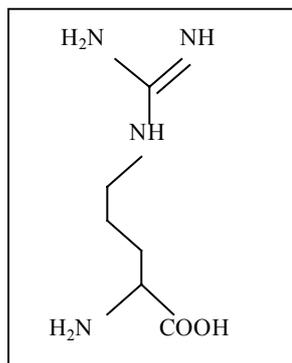
Die Dermis und Subkutis sind von einem komplexen Blutgefäßsystem durchzogen. Dabei erfolgt die Blutversorgung in der Haut über ein Zu- und Ableitungssystem, das sich aus Arterien und Venen zusammensetzt sowie über das mikrovaskuläre Gefäßnetz, das sich in zwei horizontale Plexus, dem oberflächlichen (Grenzfläche zwischen papillärer und retikulärer Dermis) und dem tiefen (Grenze zwischen Dermis und Subkutis, ca. 50 µm Durchmesser) Plexus gliedert. Die zwischen beiden Plexus liegenden Verbindungsgefäße komplettieren das mikrovaskuläre Gefäßnetz. Die bis an die Epidermis reichenden Papillenspitzen der Dermis werden von vertikalen Kapillarschleifen (17-26 µm Durchmesser), ausgehend vom oberflächlichen Plexus, durchzogen. Hauptsächlich setzen sich beide horizontalen Plexus aus Arteriolen, arteriellen und venösen Kapillaren sowie postkapillären Venolen zusammen. Letztere stellen Hautgefäße mit dem größten kumulativen Querschnitt dar, was die Funktion eines Reservoirs ermöglicht. Die dort vorherrschende geringe Blutflussgeschwindigkeit und die Dünnwandigkeit gewährleisten die notwendige Interaktion zwischen Blutzellen und Endothelium. Über Beteiligung von Mediatoren können dadurch entzündliche Reaktionen im Hautgewebe initiiert und unterhalten werden. Zu einem der wesentlichen physiologischen Prozesse im Hautorgan, bei denen die äußerst dichte Gefäßversorgung einen entscheidenden Beitrag leistet, zählt die Thermoregulation, wobei unter bestimmten äußeren (Hitze) und inneren Bedingungen (Fieber) die Durchblutung der Haut auf das 10-20fache gesteigert werden kann. Die Ableitung der Wärme erfolgt dabei über den oberflächlichen Plexus. Außerdem wird die Haut über das Gefäßsystem mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt (Detmar et al., 1992; Petzelbauer et al., 1993; Gille et al., 1996; Fritsch, 1998; Braverman, 2000).

Der Innenraum der Blutgefäße wird von Endothelzellen ausgekleidet. Größenmäßig entspricht dies einer Gesamtfläche von ca. 6300 m<sup>2</sup> im Organismus. Aufgrund der Lokalisation der Endothelzellen an der Grenzfläche zwischen fließendem Blut und Gewebe kommt diesen Zellen eine besondere Bedeutung zu. So tragen sie zum Stoffaustausch bei, sind an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt und sind

maßgeblich in Wundheilungs- und Entzündungsprozesse involviert. Unter Mitwirkung verschiedener Mediatoren (z.B. Zytokine, Neuropeptide) kommt es direkt oder indirekt (z.B. Stickstoffmonoxid) zur Relaxation oder in Gegensatz dazu beispielsweise durch Endotheline, die von Endothelzellen selbst sezerniert werden, zur Vasokonstriktion der vaskulären glatten Muskelzellen. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität ist die Folge einer Kontraktion der Endothelzellen, die durch Histamin, Leukotriene oder durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ ) hervorgerufen werden kann. Eine essentielle Voraussetzung für diese hämodynamischen Vorgänge ist eine gesicherte Kontaktaufnahme der Blutzellen mit den Endothelzellen. Hierbei wirken Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche der Endothelzellen (P-Selektin, E-Selektin, Integrine), die beispielsweise mit Leukozyten des zirkulierenden Blutes interagieren und somit das Weiterleiten von physiologisch und pathologisch relevanten Signalen gewährleisten. Die dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, insbesondere die der postkapillären Venen, stellen eine wichtige Zellpopulation in der Haut dar. Als funktionelle Einheit zusammen mit Perizyten, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten und dermalen dendritischen Zellen sind sie maßgeblich an der Initialisierung und Unterhaltung entzündlicher Vorgänge, an Gerinnungs- und fibrinolytischen Prozessen, der Angiogenese (Gefäßneubildung), Tumorwachstum und an der Metastasierung beteiligt. Hinsichtlich der Struktur des Endotheliums werden die mikrovaskulären Endothelzellen dem kontinuierlichen Typ zugeordnet. Das heißt, lückenlose Nachbarschaft zwischen den Zellen für einen optimalen Stoffaustausch. Hinsichtlich ihrer Bedeutung bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen müssen mikrovaskuläre Endothelzellen von Endothelzellen großer Gefäße unterschieden werden. Das betrifft unter anderem das Wachstumsverhalten, die Fähigkeit zur Tubenformation, das Sekretionsprofil bestimmter Prostaglandine, die Expression und Regulation von Zelladhäsionsmoleküle und Leukozyten-, „homing moleküle“ (Ruszczak et al., 1990; Swerlick et al., 1991; Ades et al., 1992; Detmar et al., 1992; Swerlick et al., 1992; Hewett and Murray, 1993 [Review]; Marui et al., 1993; Petzelbauer et al., 1993; Swerlick and Lawley, 1993; Heckmann et al., 1994; Sepp et al., 1994; Xu et al., 1994; Alberts et al., 1995; Frank et al., 1996; Gille et al., 1996; Gille et al., 1997; Gupta et al., 1997; Mason et al., 1997; Chan et al., 1998; Fritsch, 1998; Richard et al., 1998; Lee et al., 1999; Binion et al., 2000; Braverman, 2000).

## 2.2 Biochemische und physiologische Eigenschaften von L-Arginin

L-Arginin (2-Amino-5-guanidovaleriansäure) stellt eine nicht-essentielle, kationische Aminosäure dar und zählt wie auch Lysin und Histidin zur Gruppe der Diaminomonocarbonsäuren. In der Seitenkette trägt Arginin eine zusätzliche basische Gruppe (Abb. 1). Die Aminosäure ist leicht wasserlöslich, hat glukoplastische Eigenschaften und wird von den meisten Säugern selbst synthetisiert. Dabei ist L-Arginin ein Produkt des Harnstoffzyklus und wird aus L-Ornithin über L-Citrullin und Argininosuccinat gebildet. Außerdem erfolgt die Bereitstellung dieser Aminosäure durch die hydrolytische Spaltung Arginin-haltiger Peptide bzw. Proteine. Im Blut kann die Konzentration an L-Arginin ca. 100  $\mu\text{M}$  betragen. Die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration in Endothelzellen wird in der Literatur mit 0,1-1 mM angegeben (Arnal et al., 1995; Bogle et al., 1996; Harrison, 1997).



**Abb. 1:** Strukturformel von L-Arginin; Molekulargewicht 174,20 g/mol; Summenformel  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ .

Die Aufnahme von L-Arginin in die Zellen findet bei Säugern über verschiedene, unabhängig voneinander agierende Transportsysteme ( $\text{y}^+$ ,  $\text{b}^{0,+}$ ,  $\text{y}^+\text{L}$ ,  $\text{B}^{0,+}$ ) statt. Eine dominierende Rolle spielt dabei das  $\text{y}^+$ -System, über das ca. 60-80% des gesamten L-Arginintransportes ablaufen. Das  $\text{y}^+$ -System ist ein selektiver Transporter für kationische Aminosäuren, durch das neben L-Arginin auch L-Lysin und L-Ornithin die Membran passieren. Weitere wesentliche Merkmale dieses Transportsystems sind die L-Isomerspezifität und die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - sowie pH-Unabhängigkeit. Die Kontrolle der

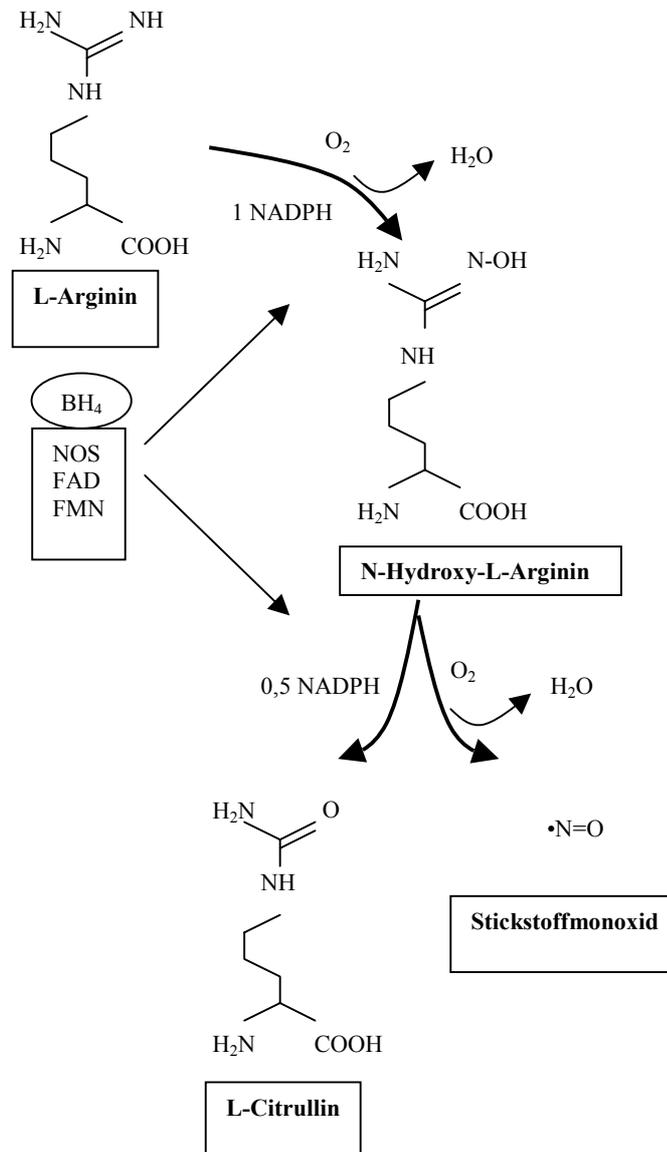
Transportaktivität erfolgt über die Hyperpolarisation der Zellmembran, die durch Öffnung von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen erzielt wird. Die molekulare Identifikation des humanen Transporters erbrachte vier am Strukturaufbau beteiligte Proteine: hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3, wobei die Expression der einzelnen Proteine organ- bzw. -gewebespezifisch ist (Collarani and Oxender, 1987; Vam Winkle et al., 1988; Segel et al., 1995; Christensen et al., 1996; Sobrevia et al., 1996; Stevens et al., 1996; McDonald et al., 1997).

Intrazellulär wird L-Arginin von verschiedenen Enzymsystemen als Substrat genutzt. Zum einen wird die Aminosäure als Precursor für Stickstoffmonoxid von NO-Synthasen über Oxidationsreaktionen umgesetzt. Zum anderen metabolisiert die Arginase, das finale Enzym des Harnstoffzyklus, L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin. Letztere Verbindung bildet die Vorstufe für Prolin, das in die Collagensynthese einfließt und für Polyamine (Putrescin, Spermidin, Spermin), die wichtige Mediatoren des Zellwachstums und der –differenzierung sowie der Proliferation darstellen. Außerdem steht L-Arginin als Stickstoffquelle für die Proteinbiosynthese zur Verfügung und stellt einen essentiellen Cofaktor der Pyrimidinsynthese dar (Hassan and Milner, 1981; Cynober, 1994; Ketteler et al., 1994; Roth et al., 1994; Hoshida et al., 1996; Sobrevia et al., 1996; Avila-Chavez et al., 1997; Harrison, 1997; Kurz and Harrison, 1997; Deves and Boyd, 1998; Selamnia et al., 1998; Jude et al., 1999; Abd-El-Aleem et al., 2000; Dall’Asta et al., 2000; Özmeric et al., 2000; Singh et al., 2000; Chang et al., 2001; Colleluori and Ash, 2001).

### **2.3 NO-Synthasen**

Die Umsetzung von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid wird durch NO-Synthasen katalysiert. Dabei agieren L-Arginin, molekularer Sauerstoff und NADPH als Cosubstrate. Essentielle Cofaktoren für die NO-Generierung sind Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD), Häme und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>). Während der Umsetzung der Aminosäure erfährt das Guanidino-Stickstoffmolekül eine mehrschrittige-Elektronenoxidation bis zum Stickstoffmonoxid. NADPH überträgt dabei zwei Elektronen zuerst auf Häme-gebundenes L-Arginin, wobei das Intermediat

N<sup>0</sup>-hydroxy-L-Arginin entsteht. Bei dieser Reaktion wird ein Molekül Sauerstoff (O<sub>2</sub>) umgesetzt. Ausgehend von N<sup>0</sup>-hydroxy-L-Arginin erfolgt ein weiterer Oxidationsschritt. Dabei werden ein weiteres Elektron (NADPH) und ein Molekül O<sub>2</sub> verbraucht (Abb. 2).



**Abb. 2:** Biosynthese von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin (nach Nathan, 1992).

Die NOS-katalysierte NO-Generierung kann mit der folgenden Gleichung zusammengefasst werden:



Die NO-Synthase stellt ein Homodimer dar, wobei jedes Monomer (130-160 kDa) am N-terminalen Ende eine Häme-Oxygenase-Domäne mit einer Bindungsstelle für L-Arginin, BH<sub>4</sub> und Häme besitzt. Das C-terminale Ende repräsentiert eine Reduktaseeinheit mit einer Bindungsstelle für NADPH, FMN und FAD. Innerhalb der NO-Synthasen werden drei Isotypen unterschieden, die in ihrer Regulation der Aktivität und der Expression differieren. Die Präsenz der einzelnen Isoenzyme ist zudem zell-, gewebe- und artspezifisch. Hinsichtlich ihrer Expression steht der konstitutive (cNOS) dem induzierbaren (iNOS bzw. NOS2) Isotyp gegenüber. Permanent exprimiert werden zum einen die endotheliale NO-Synthase (eNOS bzw. NOS3) und zum anderen die neuronale NO-Synthase (nNOS bzw. NOS1). Beide Isotypen sind außerdem dadurch gekennzeichnet, daß die NO generierende Reaktion von der Anwesenheit des Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Komplexes (Ca<sup>2+</sup>/CaM) abhängt. Anhand von molekularbiologischen und histochemischen Untersuchungen wurde die eNOS unter anderem bereits in Endothelzellen, epithelialen Zellen (z.B. Keratinozyten), Herzmyozyten, Blutplättchen und neuronalen Zellen nachgewiesen. Die neuronale NOS ist außer im Hirngewebe und in peripheren Nervenzellen auch in Muskelzellen lokalisiert. Die induzierbare Isoform der NOS wurde erstmalig in Makrophagen nach Stimulation mit Endotoxinen und Zytokinen detektiert, später auch in anderen Zelltypen, wie z.B. Hepatozyten, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Zu solchen inflammatorischen Zytokinen zählen unter anderem Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Eine Induktion der iNOS bewirken außerdem Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) (Hibbs et al., 1992; Nathan, 1992; Pou et al., 1992; Werner-Felmayer et al., 1993; Culcasi et al., 1994; Roth et al., 1994; Deliconstantinos et al., 1995; Villiotou and Deliconstantinos, 1995; Baudouin and Tachon, 1996; Sakai et al., 1996; Wang et al., 1996; Harrison, 1997; Michel and Feron, 1997; Bruch-Gerharz et al., 1998; Babu and Griffith, 1998; Teng et al., 1998; Ahmed and van den Oord, 1999; Beck et al., 1999; Frank et al., 1999; Hoffmann et al., 1999; Stallmeyer et al., 1999; Kubes, 2000; Sasaki et al., 2000; Govers and Rabelink, 2001; Heller et al., 2001; Rocha and Guillo, 2001; Stefano and Magazine, 2001; van Hinsbergh, 2001). Die unterschiedlichsten Lokalisationen im Säugetierorganismus zeigt die Diversität der funktionalen NO-Generierung. Die Bedeutung der über die verschiedenen NOS-Isotypen katalysierte NO-Freisetzung wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

## 2.4 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der Reaktionsprodukte des L-Argininmetabolismus und wurde ursprünglich als ein „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) identifiziert. Aufgrund eines ungepaarten Elektrons trägt dieses labile, kurzlebige (Halbwertszeit  $t_{1/2} = 5-30$  sec), gasförmige Molekül radikalischen Charakter. NO wurde bereits in verschiedenen Zelltypen diverser Organsysteme nachgewiesen, wie dem zentralen und peripheren Nervensystem, der Lunge, der Leber, dem Gastrointestinaltrakt, den Blutgefäßen, dem Immunsystem und der Haut. Das Molekül agiert bei der inter- und intrazellulären Kommunikation als „messenger molecule“. Die Beteiligung von NO an einer Vielzahl physiologischer Prozesse spiegelt die Bedeutung dieses Moleküls wider. So sind beispielsweise die komplexen Vorgänge der Vasodilatation (Gefäßerweiterung), der Neurotransmission, Peniserektion und der intestinalen Peristaltik NO-vermittelt. Eine zentrale Rolle spielt Stickstoffmonoxid zudem in der Immunabwehr, der Immunregulation und bei Autoimmunerkrankungen. Hinzu kommt die Wirkung als zelluläres Toxin gegenüber eingedrungenen Pathogenen (Bakterien), Tumorzellen oder geschädigten Zellen. Dem Signalmolekül wird außerdem eine entscheidende Rolle bei den Vorgängen der Wundheilung und der Angiogenese zugeschrieben. Diese aufgezeigten, einen komplexen Bereich umfassenden regulatorischen Funktionen von Stickstoffmonoxid können nur bei physiologisch optimalen Konzentrationen erfüllt werden. Hohe freigesetzte NO-Mengen wirken zytotoxisch. So kann NO mit Eisen-Schwefel-enthaltenden mitochondrialen Enzymen reagieren und sie dadurch inaktivieren. Die DNA- und Proteinsynthese kann ebenso durch NO gehemmt werden. Die schnell ablaufende bimolekulare Reaktion von NO mit Superoxid ( $O_2^-$ ) liefert ein weiteres, äußerst reaktives Molekül, das Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Diese Stickstoff-haltige Verbindung weist ein enormes oxidatives, schädigendes Potential gegenüber Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, DNA, subzellulären Organellen und anderen Zellsystemen auf. (Beckman et al., 1990; Nathan, 1992; Busconi and Michel, 1993; Rubbo et al., 1994; Deliconstantinos et al., 1995; Hirata et al., 1995; Jenkins et al., 1995; Villiotou and Deliconstantinos, 1995; Deliconstantinos et al., 1996a; Goldsmith et al., 1996; Sakai et al., 1996; Salvemini et al., 1996; Geiger et al., 1997; Harrison, 1997; Kurz and Harrison, 1997; Liaudet et al.,

1997; Michel and Feron, 1997; Bruch-Gerharz et al., 1998; Brovkovich et al., 1999; Clough, 1999; Frank et al., 1999; Jude et al., 1999; Suschek et al., 1999; Weller, 1999; Ahmed and van den Oord, 2000; Frank et al., 2000; Goligorsky et al., 2000; Lee et al., 2000(b); Rossi et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Shi et al., 2000; Zanetti et al., 2000; Galley et al., 2001; Saito et al., 2001; Stefano and Magazine, 2001).

Eine physiologisch besonders wichtige Reaktion von Stickstoffmonoxid ist die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch Nitrosation. Die daraus resultierende Erhöhung des Gehaltes an cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) hat einen weiteren Effekt auf die Aktivität anderer Proteine, wie die von cGMP-regulierten Phosphodiesterasen, cGMP-abhängigen Proteinkinasen und von cGMP-regulierten Ionenkanälen. Proteinkinasen, wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) können außerdem durch NO selbst aktiviert werden und damit Signalkaskaden auslösen. Eine Folge der durch den erhöhten cGMP-Gehalt stattfindenden Prozesse ist eine Inaktivierung der kontraktilen Elemente der glatten Muskelzellen der Gefäßwand, was in einer Vasodilation resultiert (Roth et al., 1994; Bogle et al., 1996; Sirsjö et al., 1996; Geiger et al., 1997; Teng et al., 1998; Beck et al., 1999; Yamawaki et al., 1999).

Das in den verschiedensten Gewebetypen synthetisierte Stickstoffmonoxid wird in kürzester Zeit in seine stabilen Oxidationsprodukte, dem Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und dem Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) umgewandelt. Außerdem können als weitere NO-Folgeprodukte  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , Nitrosamine, Nitrosothiole (Nicht-Proteine) und S-nitrosylierte Proteine im umgebenden Milieu NOS-aktiver Zellen auftreten. (Hibbs et al., 1992; Nathan, 1992; Roth et al., 1994; Villiotou and Deliconstantinos, 1995; Stefano and Magazine, 2001).

Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, wie bei einem septischen Schock oder der Psoriasis, ist die Unterbindung der gesteigerten NO-Freisetzung ein Ansatzpunkt möglicher Therapiestrategien. So werden bereits diverse Inhibitoren der NO-Synthasen eingesetzt, die einerseits selektiv für die einzelnen Isotypen wirken können. Andererseits greifen Vertreter der einzelnen Inhibitorclassen verschieden in die NO-Generierung ein. In der Tabelle 1 sind einige Verbindungen als Beispiele aufgeführt, die die NO-Synthese inhibieren (Nathan, 1992; Bull et al., 1996; Bunker et al., 1996; Liaudet et al., 1997; Babu and Griffith, 1998; Clough, 1999; Huang et al., 2000; Ormerod et al., 2000).

**Tab. 1:** Beispiele für unterschiedlich wirksame Inhibitoren der NO-Synthasen (nach Nathan, 1992).

<b>Klasse</b>	<b>Konstitutive NOS (cNOS)</b>	<b>Induzierbare NOS (iNOS)</b>
Substratanaloga	N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin N-iminoethyl-L-Ornithin N <sup>ω</sup> -Amino-L-Arginin N <sup>ω</sup> -Methyl-L-Arginin N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester	N <sup>ω</sup> -Amino-L-Arginin N <sup>ω</sup> -Methyl-L-Arginin N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin
Flavoproteinbinder	Diphenylen-Iodonium	Diphenylen-Iodonium
Calmodulinbinder	Calcineurin Trifluoroperazin N-(4-Aminobutyl)-5-Chloro-2-Naphthalensulfonamid N-(6-Aminohexyl)-1-Naphthalensulfonamid	-
Häm-binder	Kohlenmonoxid	Kohlenmonoxid
Tetrahydrobiopterin-Inhibitoren		2,4-Diamino-6-Hydroxypyrimidin
Inhibitor der Induktion	-	Cortikosteroide TGF-β-1, -2, -3 Interleukin-4 Interleukin-10 Makrophagen-deaktivations-Faktor

Eine weitere Möglichkeit, die NO-Generierung einzuschränken, besteht in der Hemmung des L-Arginintransportes, so daß die intrazelluläre Verfügbarkeit dieser Aminosäure herabgesetzt ist. Zu solchen Inhibitoren zählen die kationischen Aminosäuren L-Ornithin und L-Lysin, die ebenso wie L-Arginin um das Transportsystem konkurrieren, sowie L-Homoarginin. Die bekannten eNOS-Hemmer N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N<sup>ω</sup>-Iminoethyl-L-Ornithin (L-NIO) wirken

ebenfalls inhibierend auf den L-Arginintransport (Agner and Serup, 1989; Bogle et al., 1996; Liaudet et al., 1997; Allman et al., 1998; Dolinska and Albrecht, 1998).

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Arginyl-L-Arginin	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
L-Arginyl-L-Leucin	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethyl-pyrocyanat)	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Dispase I (from <i>Bacillus polymyxa</i> )	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dynabeads (M-450)	Dynal., Oslo, Norwegen
Dynemic ET Terminator Cycle Sequence Kit	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Endothelzell-Medium (EGM-MV); mit bzw. ohne Phenolrot	Cellsystems, St. Katharinen, Deutschland
Entwickler & Fixierlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Eosin	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Ethanol (absolut)	Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
D-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Glycerol (85%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salts (HBSS)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Hoechst 33258 Färbelösung	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Isotonische Lösung	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Keratinocyte-SFM (inkl. REGF, BPE)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
L-Lysin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Glücksklee Nestlé, Frankfurt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-(1-Naphthyl)-ethylen-diamin- dihydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumnitrit (NaNO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
O'range G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Ornithin-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR-Nukleotiden-Mix (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Protein-Assay Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ready-To Go™ You-Kit (Mix-Beads incl. dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Murine Reverse Transkriptase)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA

Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin-HCl (BH <sub>4</sub> )	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37 %ig (purissimum)	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Sulfanilamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Taq-Polymerase (incl. MgCl <sub>2</sub> -Puffer)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
TRIS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Tritium-Thymidin [ <sup>3</sup> H]Thymidin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
Tween20	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
ECL-Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b><u>Antikörper und Primer</u></b>	
Anti-human-eNOS, polyklonal	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-human-iNOS, polyklonal	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-PECAM-1 (CD31), monoklonal	R&D Systems, Abingdon, UK
Anti-Rabbit IgG, Peroxydase-konjugiert	Calbiochem, Canada
Anti-von Willebrand (anti-vWF-FITC)	CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen, Deutschland
Goat-IgG-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, Kanada
Primer (sense) und (antisense) für eNOS, iNOS, GAPDH	Metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, Martinsried, Deutschland
Randomprimer (pd(N) <sub>6</sub> )	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
<b><u>Zusammensetzung der Puffer</u></b>	
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Ladepuffer	1 mM EDTA + 30% Glycerol + 1 Spatel- spitze O'range G
Mc Ilvain Puffer	Lösung A: 0,1 M Zitronensäure Lösung B: 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8,6 ml Lös. A + 10,4 ml Lös. B, pH 5,5
PBS-Puffer (phosphat buffered saline)	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O ad 1000 ml A. bidest. pH 7,4 (mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl)
Puck/EDTA	0,4 g KCl + 8,0 g NaCl + 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> + 1,0 g D-Glucose + 5 mg Phenolrot + 0,255 g EDTA ad 1000 ml A. bidest.
Sammelgelpuffer (10%) SDS-Probenpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,5), 0,8% SDS 5% Mercaptoethanol, 2,8% SDS, 14% Glycin, 90 mM Tris pH 6,8, 0,1 % Bromphenolblau
Szintillator	4,0 g 2,5-Diphenyloxazol + 0,1 g 1,4-bis-2- (5-Phenyloxazolyl)-benzen ad 1000 ml Toluol, 2-3 h kräftig schütteln
TBE-Puffer (10 ×)	500 mM TRIS + 500 mM Borsäure + 20 mM EDTA ad 1000 ml A. bidest., pH 8,2
TBS-Puffer (10 ×)	0,1 M Tris pH 7,4, 1,54 M NaCl in A. bidest.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,8% SDS
Tyrode-Eosin-Lösung	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,2 g CaCl <sub>2</sub> + 0,1 g MgCl <sub>2</sub> + 0,05 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,0 g NaHCO <sub>3</sub> + 1,0 g Glucose + 0,625 g Eosin ad 1000 ml A. bidest.
Westernblotpuffer	20 mM Tris pH 8,8, 150 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol

### 3.2 Geräte und Hilfsmittel

Absorptionsreader (MTP-Photometer)	Labsystems iEMS Reader MF, Helsinki, Finnland
------------------------------------	--

Software zum Absorptionsreader	Sero Calc Vers. 4.0
Analysenwaage	Typ MC5_OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Blot-Apparatur	Hoefler SemiPhor, Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Brutschrank	Vitromat Mytron, Typ sbs-11, Heiligenstadt, Deutschland INCO 2 Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Cell-Harvester und Vakuum-Controller	INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
Deckgläser	VEB Ilmenau, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Durchflußcytometer (FACScan)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Software zum Durchflußzytometer	PASCAL 3.22 (Systemsoftware) Lysis II Vers. 1.1 CellFit-Software Vers. 2.01.2
Elektrophoresekammer (incl. Gelschlitten) [horizontal]	OWI Separation Systems, Porthmouth, Niederlande
Elektrophorese-Apparatur [vertikal]	Hoefler, Amersham Pharmacia Biotech; San Francisco, Kalifornien, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,7 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge	EC 5402, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler	WINSPECTRAL 1414 Liquid Scintillation Counter, WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, Deutschland
Füllspatel	VEB Dentalfabrik Treeurt, Deutschland
Gelblotting-Filterpaper (0,37 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Gewebekulturflaschen und -schalen (25-cm <sup>2</sup> , 75-cm <sup>2</sup> , Ø 60 mm)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Glasfiberfilter	Typ G-7, INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA

Kühlzentrifuge	Biofuge primo R, Heraeus Instruments, Gera, Deutschland
Software für ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Küvette (4,5 ml)	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Laminarbox	HS 12, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	MLW Rührerätewerk Medingen, Sitz Freital, Deutschland Typ R3T Variomag Elektronorührer Poly15, Laborbedarf K.J. Werner GmbH, Leipzig, Deutschland
„Magnetic Particle Concentrator“ (MPC)	Dynal, Oslo, Norwegen
Mikroskope	Telaval 3, Carl Zeiss Jena, Deutschland Olympus CK 2, Tokyo, Japan Olympus BX50, Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
96er und 24er Mikroliterplatten (MTP)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikrowelle	Typ M 633, Samsung electronics GmbH, Steinbach, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membran	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter pH 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaagen	Typ 870-13, G. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland UMC 5, Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Quarzküvette (50 µl)	Typ Hellma, Novodirekt GmbH, Kehl, Deutschland
Röntgenfilm (FCW-Retina XBD 13 × 18)	B.W. Plus Röntgenvertrieb GmbH, Kamp/Lintfort, Deutschland
Schüttelgeräte	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, Deutschland Heidolph unimax 2010,

	Deutschland
	IKA-Schüttler MTS2, IKA-Labortechnik Janke & Kunkel GmbH & CoKG., Staufen, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius Minisat, steril, 600kPa max, 0,22 µm
Stromversorgungsgeräte	Consort E835 OWI Separation Systems, Portsmouth, Niederlande
Szintillationsmeßgefäße	EPS 600, Pharmacia Biotech, Schweden Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler 5330, Eppendorf-Netheler- Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 102 H, Bandlin Elektronik, Berlin, Deutschland
UV-Tisch	Syngene
UV-Vis-Spektrophotometer	UV mini 1240, Shimadzu Corp., Japan
VDS-Film für den ImageMaster	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Vortex genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Thermostad B3-DC 1, Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellcoulter	Beckman Coulter, Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zellsieb	100 µm, Becton Dickinson, NJ, USA

### **3.3 Isolierung und Kultivierung humaner dermaler mikrohämovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)**

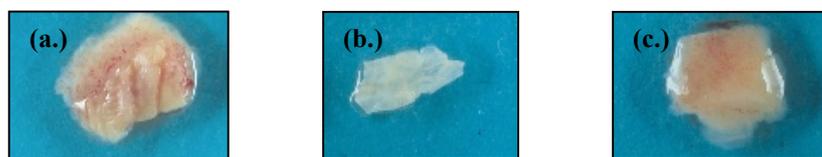
#### **3.3.1 Isolierung von HDMEC**

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) wurden aus Vorhautgewebe von 1 bis 10jährigen Spendern gewonnen. Die bereits bekannte Methode von Hewett and Murray (1993) zur Isolierung von HDMEC wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert und optimiert. Das Prinzip dieser Methode ist die

immunomagnetische Separierung der mikrovaskulären Endothelzellen mit Hilfe von Mikrobeads (Dynabeads), die mit Antikörpern gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle beschichtet sind.

Bei den eingesetzten Mikrobeads handelte es sich um uniforme, superparamagnetische, monodisperse, polymere Partikel aus  $\delta\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , die eine Größe von  $4,5\ \mu\text{m}$  haben. Diese wurden mit anti-PECAM-1 Antikörpermolekülen (CD31) beschichtet, die Endothelzellen-spezifisch binden. Dabei bilden sich Dynabead-Endothelzellkomplexe, die durch den Einsatz eines „Magnetic Particle Concentrator’s“ von der heterogenen Zellsuspension separiert werden können. Auf eine solche Weise isolierte Zellen sind lebensfähig, kultivierbar und für in vitro Versuche einsetzbar (Drancourt et al., 1992; George et al., 1992; Leach et al., 1994).

Zum Anlegen der Primärkultur wurden die nach der Exzision erhaltenen, ca.  $2\ \text{cm}^2$  großen Hautstücke in einer Transportlösung ( $25\ \mu\text{g}$  Gentamycin in  $5\ \text{ml}$  SFM) bei  $4\ ^\circ\text{C}$  bis zur Präparation maximal für  $4\ \text{h}$  gelagert. Nachdem das subkutane Fettgewebe mechanisch entfernt und die Haut in  $5 \times 5\ \text{mm}$  große Stücke geschnitten wurde, erfolgte eine Inkubation über Nacht bei  $4\ ^\circ\text{C}$  in einer sterilen Dispaselösung I ( $2\ \text{mg/ml}$  in HBSS mit  $25\ \mu\text{g}$  Gentamycin). Die Hautstücken wurden aus der Dispaselösung genommen, die Epidermis mechanisch entfernt (Abb. 3) und das dermale Gewebe in einer sterilen HBSS/Gentamycinlösung mit Hilfe von Pinzette und Schere zerkleinert.



**Abb. 3:** Hautgewebe vor und nach der Dispasebehandlung; (a.) komplettes Hautgewebe, (b.) Epidermis, (c.) Dermis.

Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation in  $2\text{--}5\ \text{ml}$   $0,05\%$  Trypsin/EDTA bei  $37\ ^\circ\text{C}$ , wobei die Lösung mehrmals leicht geschüttelt wurde. Daran schloß sich die Filtration der Zellsuspension durch ein Zellsieb ( $100\ \mu\text{m}$  Porengröße) an. Um eine

weiterführende Trypsinaktivität zu vermeiden, wurden 2 ml 5% FKS/HBSS zugegeben. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 1500 U/min wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 0,5 ml 5% FKS/HBSS resuspendiert und mit anti-CD31-beschichteten Dynabeads leicht schüttelnd bei 4 °C für 20 min inkubiert.

Die Beschichtung der Dynabeads wurde zuvor folgendermaßen durchgeführt:

1. 25 µl (entsprechen  $10^7$  Beads) in steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführen
2. Reaktionsgefäß in den „Magnetic Particle Concentrator“ (MPC) für 1 min stellen
3. Überstand mit einer Pipette entfernen
4. Reaktionsgefäß aus dem MPC nehmen, Dynabeads mit 0,5 ml 0,1% BSA/PBS resuspendieren
5. Reaktionsgefäß in den MPC für 1 min stellen
6. Schritte 3 bis 5 fünfmal wiederholen
7. Überstand entfernen, Reaktionsgefäß aus dem MPC nehmen, in 20–40 µl 0,1% BSA/PBS resuspendieren und 2 µl anti-CD31-AK ( $2 \mu\text{g}/10^7$  Dynabeads) zugeben
8. Inkubation bei 4 °C und leichtem Schütteln für 30 min
9. Reaktionsgefäß für 1 min in den MPC stellen
10. Waschschritte wie Punkte 3 bis 5 dreimal wiederholen
11. Anti-CD31-beschichtete Dynabeads in 50 µl 0,1% BSA/PBS resuspendieren und bis zum Gebrauch bei 4 °C lagern.

Im Anschluß an die Inkubation der Zellen mit den anti-CD31-beschichteten Dynabeads erfolgte die Zellseparierung ebenfalls mit Hilfe des MPC, wobei das Reaktionsgefäß mit den Zellen und den Dynabeads so lange im MPC verblieb (ca. 2 bis 5 min), bis das Pellet an der Gefäßwand sichtbar wurde. Hohe Mengen an herausgelöstem Zellmaterial verursachen eine starke Trübung. In diesem Fall muß die Verbleibdauer im MPC verlängert werden. Nachdem sich ein klares Pellet gebildet hatte, wurde der Überstand, der sämtliche Zellen enthielt, die nicht mit den anti-CD31-beschichteten Dynabeads komplexierten, mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß dem MPC entnommen, das Pellet in 0,5 ml 5% FKS/HBSS resuspendiert und mittels MPC fünfmal mit 5% FKS/HBSS gewaschen. Schließlich wurden die separierten Zellen in EGM-MV (mit 5% FKS, 50 µg/ml Gentamycin, 50 ng/ml Amphotericin-B, 1 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml hEGF, 12 µg/ml Rinderhirnextrakt) suspendiert und in 25-cm<sup>2</sup>-

Kulturflaschen, gefüllt mit 5 ml EGM-MV, bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Es wurden pro Hautprobe eine Kulturflasche zum Anlegen der Primärkultur angesetzt, wobei eine adhärente Einzelschicht (Monolayer) nach etwa 9 bis 11 Tagen erhalten werden konnte. Ein Mediumwechsel fand jeden zweiten Tag statt.

### 3.3.2 Subkultivierung und Passagierung von HDMEC

Zur Subkultivierung wurde das Kulturmedium entfernt und die adhärenen mikrovaskulären Endothelzellen mehrmals mit PUCK/EDTA gespült. Danach wurden 2 ml (pro 25-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche) 0,05% Trypsin/EDTA zugegeben und für maximal 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 5% FKS/HBSS wurde die proteolytische Trypsinwirkung inaktiviert, woran sich eine Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 min anschloß. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1–2 ml EGM-MV suspendiert und die Zellanzahl bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension mit 200 µl Thyrode-Eosinlösung (Vitalfärbung) gemischt (Verdünnung 1:5), in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer gefüllt, die lebenden Endothelzellen in fünf Gruppenquadraten unter einem Lichtmikroskop ausgezählt, addiert und die Gesamtzellanzahl unter Berücksichtigung des Kammerinhaltes ( $\times 1000$ ), des Verdünnungsfaktors und des Suspensionsvolumens berechnet. Die Zellsuspension wurde anschließend mit dem entsprechenden Volumen an Kulturmedium ergänzt, um eine Konzentration von 1 Mio Zellen pro ml zu erreichen. In Abhängigkeit von den nachfolgenden Zellversuchen wurden Zellen in 24er MTP mit einer Aussaatdichte von 10000 Zellen/1 ml oder in Kulturschalen ( $\varnothing$  60 mm) bzw. Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit 0,16 Mio/5 ml angesetzt. Die Passagierung erfolgte in 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (1 Mio Zellen/20 ml), wobei ebenfalls jeden 2. Tag ein Mediumwechsel stattfand. Nach 5–7 Tagen Wachstumsdauer konnte eine konfluente Monolayer erhalten und für die nächste Passage genutzt werden. Die Kultivierung erfolgte, wie bereits oben beschrieben, in EGM-MV bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Für Zellversuche wurden die 1.–3. Passage verwendet.

### 3.4 Charakterisierung von HDMEC

#### 3.4.1 Flowcytometrische Bestimmung des von Willebrand Faktors

Die Identität und Reinheit einer Zellkultur kann nicht nur anhand von morphologischen Kriterien, sondern auch anhand von bestimmten biochemischen Parametern festgestellt werden. Um die Effizienz der Methode zur Separierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen unter Verwendung von anti-CD31-beschichteten Dynabeads zu untersuchen, wurde der von Willebrand Faktor (Faktor VIII) als ein weiterer charakteristischer Marker für Endothelzellen bestimmt (Jackson et al., 1990; Ruszczak et al., 1990; Bull et al., 1991; George et al., 1992; Ades et al., 1992; Detmar et al., 1992; Bernd et al., 1993; Swerlick and Lawley, 1993; Petzelbauer et al., 1993; Heckmann et al., 1994; Xu et al., 1994; Cornelius et al., 1994; Jones, 1996; Gille et al., 1996; Kluger et al., 1996; Gupta et al., 1997; Heckmann et al., 1997; Mason et al., 1997; Chan et al., 1998; Richard et al., 1998).

Adhärente Zellen der Primärkultur wurden, wie bereits unter 3.3.2 beschrieben, mit PUCK-EDTA gespült, mit 0,05% Trypsin-EDTA und 5% FKS/HBSS behandelt und nach Bestimmung der Zellanzahl mit Hilfe eines Zellcoulters eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 Mio Zellen in 0,5 ml PBS-B (PBS, pH 7,4 + 1% BSA) hergestellt und in Falcon-Tubes überführt. Anschließend wurden die Zellen folgendermaßen für die flowcytometrische Analyse präpariert:

1. Zentrifugation (3 min, 1250 U/min), Überstand dekantieren, Zellpellet aufklopfen
2. Zugabe von 1 ml eiskaltem (-20 °C) Methanol (Fixierung)
3. Zentrifugation (siehe Punkt 1.)
4. Zugabe von 1 ml PBS-B
5. Zentrifugation (siehe Punkt 1.)
6. Zugabe von 1 ml PBS-T (PBS-B + 0,2% Tween20 v/v) (Permeabilisierung)
7. Zentrifugation (siehe Punkt 1.)
8. Zugabe von 10 µl vorverdünnten Anti-human-vWF-FITC (1 µg/10 µl in PBS-B) bzw. 10 µl Goat-IgG-FITC (Isotypkontrolle, Konzentration: 1 µg/10 µl)
9. 30 min Inkubation im Dunkeln
10. Waschen mit 1 ml PBS-B und Zentrifugation (siehe Punkt 1.), 2× wiederholen

11. Zugabe von 0,5 – 1 ml PBS und flowcytometrische Messung innerhalb 1 h.

Parallel zur Untersuchung des vWF in einer Primärkultur von gereinigten HDMEC wurde eine Zellpopulation eingesetzt, die zuvor nicht mit anti-CD31-beschichteten Dynabeads separiert wurden. Diese heterogene Population wurde identisch präpariert und ebenfalls der flowcytometrischen Analyse zugeführt.

### **3.4.2 Mycoplasmentest**

Die Zellkultur einzelner Passagen der isolierten HDMEC wurde stichprobenartig auf Mycoplasmenfreiheit überprüft. Hierzu wurden die Zellen für 48–72 h auf sterilen Deckgläsern, die in EGM-MV gefüllten Kulturschälchen lagen, im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Die mit einzelnen Zellcluster bewachsenen Deckgläser wurden mit PBS gespült und 5 min mit 3 ml Fixierlösung (Eisessig:Methanol = 1:3) fixiert. Der Fixierungsvorgang wurde dreimal wiederholt. Nachdem die Deckgläser an der Luft getrocknet waren, wurden diese 10 min mit einer Färbelösung (0,1 µg/ml, Hoechst 33258) behandelt und nach zweimaligem Waschen mit A. bidest. auf Objektträgern mit 1 Tropfen Mc Ilvain-Puffer gebettet. Dem schloß sich die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop an (Chen, 1977).

### **3.4.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von HDMEC**

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten HDMEC wurde das Proliferationsverhalten bzw. die DNA-Syntheseleistung in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Kultivierung untersucht. Als Marker für die Synthesephase des Zellzykluses wurde der Einbau von radioaktiven [<sup>3</sup>H]Thymidins gemessen.

HDMEC wurden mit einer Zellaussaatdichte von 10000 Zellen/ml in 24er MTP (1 ml/well) in EGM-MV im Brutschrank kultiviert. Nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen (1. Tag – 7. Tag) wurde dem Kulturmedium jeweils einer 24er

MTP radioaktives [ $^3\text{H}$ ]Thymidin (20  $\mu\text{l}$ /well; 0,5  $\mu\text{Ci}$ ) zugesetzt und 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium mittels Cell-Harvester aspiriert und jedes well mit A. bidest. mehrmals gespült. Pro well wurden danach 200  $\mu\text{l}$  0,05% Trypsin-EDTA zugegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurden ebenfalls mittels Cell-Harvester die abgelösten Zellen aspiriert und auf bereits ausgestanzte, angefeuchtete Glasfiberfilter übertragen. Die MTP wurde mehrmals mit A. bidest gespült, wobei auch das Spülwasser den Filter passierte. Pro well wurde ein Filter erhalten und in ein Szintillationsmeßgefäß überführt. Nach dem Trocknen bei RT wurde in jedes Meßgefäß 4 ml Szintillatorflüssigkeit gegeben und unter Mitführung zweier Leerwerte im Flüssigkeitsszintillationszähler nach dem  $^3\text{H}$ -Meßprotokoll vermessen.

### 3.5 Inkubationsschemata von potentiell NO-Synthase-modulierenden Substanzen

HDMEC der 1.–3. Passage wurden in Kulturschälchen ( $\varnothing$  60 mm) kultiviert. Nach Erreichen einer 70–80%igen Konfluenz (ca. 3 Tage) erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Substanzen. Hierfür wurde das Kulturmedium (EGM-MV) entfernt und durch 3 ml Phenolrot-freies EGM-MV ersetzt, zu dem die gelösten Substanzen zugegeben wurden:

**L-Arginin** wurde in Phenolrot-freiem Medium gelöst und jeweils 300  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Konzentration pro Kulturschälchen zugegeben, so daß Endkonzentrationen von 5, 10, 25, 50 mM erreicht wurden. In der Kontrolle waren 0,5 mM L-Arginin enthalten, was der Basalkonzentration im Phenolrot-freien Kulturmedium entspricht.

**CaCl<sub>2</sub>** wurde in Phenolrot-freiem EGM-MV gelöst und 30  $\mu\text{l}$  zur Zellkultur gegeben. Es ergaben sich Endkonzentrationen von 1 mM und 2 mM.

**(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin  $\times$  2 HCl (BH<sub>4</sub>)** wurde ebenfalls im Medium gelöst und jeweils 30  $\mu\text{l}$ /3 ml eingesetzt. Supplementiert wurden jeweils 25  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ .

**L-Ornithin-HCl und L-Lysin**, gelöst im Phenolrot-freiem Medium, wurden mit Endkonzentrationen von 1 mM und 2 mM (je 30  $\mu\text{l}$ ) in der Zellkultur eingesetzt.

Die **Dipeptide L-Arginyl-L-Arginin** und **L-Arginyl-L-Leucin** wurden im Phenolrot-freien EGM-MV gelöst und die HDMEC jeweils mit 5, 10, 25 und 50 mM inkubiert.

Alle Lösungen wurden frisch hergestellt und sterilfiltriert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h.

### **3.6 Bestimmung des Proliferationsverhaltens**

Das toxische Potential der eingesetzten Substanzen sollte anhand des Einflusses auf das Proliferationsverhalten der HDMEC untersucht werden. Als Maß für die Beeinflussung der Zellteilungsfähigkeit wurde die Zellanzahl nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen bestimmt.

Die adhärennten Zellen wurden trypsiniert und in 1 ml sterilem PBS suspendiert. Anschließend wurde die Zellanzahl mit Hilfe eines Zellcoulters bestimmt. Dabei wurden der Zellsuspension 100 µl entnommen, in einer Küvette (4,5 ml Füllvolumen) mit 4 ml einer isotonischen Lösung gemischt und dem Zählverfahren des Coulters zugeführt. Unter Berücksichtigung des Injektionsvolumens (0,5 ml), der Verdünnung in der isotonischen Lösung (Verdünnungsfaktor 41) und des Volumens der Zellsuspension wurde die Zellanzahl berechnet.

### **3.7 Untersuchungen zur Beeinflussung des L-Arginin/NO-Metabolismus in HDMEC**

Nach erfolgter Inkubation der HDMEC mit den verschiedenen Substanzen wurde deren Einfluß auf die NO-Produktion untersucht. Hierzu wurden zum einen die Aktivität über die NO-Freisetzung und zum anderen die Expression von zwei NOS-Isotypen analysiert.

### 3.7.1 Bestimmung des Nitrit-Gehaltes nach Griess

Nitrit, ein stabiles Produkt von NO, wurde spectrophotometrisch mit der Griess-Reaktion, einer etablierten Methode für die Analyse von Nitrit und Nitrat in flüssigen Medien, bestimmt (Green et al., 1982; Arnal et al., 1995; Romero-Graillet et al., 1996; Wang et al., 1996). Dabei bildet Nitrit in einer zweischrittigen Reaktion mit den beiden Griessreagenzien ein Azoprodukt, das bei einer Wellenlänge von 540 nm ein Absorptionsmaximum aufweist und somit photometrisch erfasst werden kann.

Dem Kulturmedium wurden 100 µl entnommen, in 96er MTP überführt und mit 100 µl Griess-Reagenz gemischt. Anschließend wurde innerhalb 10 min die Extinktion bei 540 nm an einem Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

#### Griess-Reagenz

Griess 1 (1% Sulphanilamid in 5%ige Phosphorsäure)

Griess 2 (0,1% N-(1-Naphthyl)ethylendiamin in 5% Phosphorsäure)

Griess 1 : Griess 2 = 1:1

Zuvor wurde eine Eichkurve mit Natriumnitrit im Konzentrationsbereich 0 – 50 µM in phenolrotfreiem EGM-MV aufgenommen. Hierbei wurde der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe von 1 Vol Griess-Reagenz berücksichtigt. Außerdem wurde die Eigenabsorption des Mediums vom gemessenen Wert subtrahiert.

### 3.7.2 Analyse der Proteinexpression der NO-Synthasen mittels Westernblot-Analyse

Dem Verfahren der Westernblot-Analyse liegt der Transfer von in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und eine anschließende Antikörper-Erkennungsreaktion zugrunde. Die Auftrennung der Proteingemische auf dem Polyacrylamidgel erfolgt mit hoher Trennschärfe. Die Grundsubstanz des Geles, das Acrylamid, ist ein Monomer und bildet durch Zugabe freier Radikale über ein Zweikomponenten-Redoxsystem (Ammoniumpersulfat und

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) in einer Kettenreaktion Polymere aus, die zu einer Gelmatrix quervernetzt werden.

### 3.7.2.1 Zellaufschluß

Die im Zellpellet befindlichen HDMEC (1 Mio) wurden in 100 µl SDS-Probenpuffer (ohne Bromphenolblau) vollständig resuspendiert und durch 10minütiges Erhitzen bei 95 °C und 2 min Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nachdem die Suspension (Rohextrakt) auf RT abgekühlt war, wurde der Proteingehalt nach der Methode von Lowry bestimmt und die Proben in der SDS-PAGE eingesetzt.

### 3.7.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Es wurden 10 µl des Rohextraktes mit A. bidest. ad 1 ml in einem Eppendorfgefäß vermischt und die Proben mit Hilfe des Protein-Assay-Kits für die Proteinbestimmung vorbereitet:

1. Zugabe von 0,1 ml DOC-Lösung (Natrium-deoxycholat, 1,5 mg/ml) zu den Proben und zum Leerwert (1 ml A. bidest.)
2. Mischen und 10 min Inkubation bei RT
3. Zugabe von 0,1 ml Trichloressigsäure (72% w/v), mischen
4. Zentrifugation (5 min, 10000 U/min), Überstand verwerfen
5. Pellet in 1 ml Lowrylösung lösen und in Falcon-Röhrchen überführen
6. Eppendorfgefäß mit 1 ml A. bidest. spülen und ebenfalls zum Falcon-Röhrchen geben, mischen
7. 20 min Inkubation bei RT
8. Zugabe von 0,5 ml Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz, mischen
9. 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT
10. 200 µl in 96er well MTP überführen und Vermessen der Extinktion bei 690 nm am Mikrotiterplattenphotometer

Zuvor wurde eine Proteineichkurve im Konzentrationsbereich 0 – 300 µg/ml mit Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen.

### 3.7.2.3 Westernblot

Mit Hilfe der vertikalen Gelelektrophorese wurden die einzelnen Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Hierzu wurde dem aufgeschlossenen Zellextrakt entsprechend soviel Volumen entnommen, daß 20 µg Protein in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Pro Geltasche eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Geles wurden 30 µl aufgetragen, wobei mit SDS-Probenpuffer (mit Bromphenolblau) aufgefüllt wurde.

#### SDS-Gel

Trenngel (10%):	A. bidest.	5 ml
	Trenngelpuffer	2,5 ml
	Acrylamid (38%)	2,5 ml
	Temed	5 µl
	10% APS	75 µl
Sammelgel (5%):	A. bidest.	2,5 ml
	Sammelgelpuffer	1 ml
	Acrylamid (38%)	0,5 ml
	Temed	5 µl
	10% APS	36 µl

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 60 –80 V.

Der Proteintransfer erfolgte im „Sandwich-Verfahren“, wobei eine Blot-Apparatur, bestehend aus zwei Plattenelektroden eingesetzt wurde. Das SDS-Gel wurde luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran gelegt und diese zwischen sechs, in Westernblot-Puffer eingeweichte Whatmanpapierlagen zwischen den Plattenelektroden 1 h bei 70 – 100 mA geblottet. Im Anschluß daran wurde die Membran mit 2%

Ponceau-Lösung gefärbt, um den die Banden sichtbar zu machen. Nach mehreren Waschsritten mit 1× TBS wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht in einer Blocking-Reagenz (1× TBS + 5% Trockenmilchpulver + 0,05% Natriumazid) bei leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Blocking-Reagenz entfernt und die Membran mit dem primären Antikörper (polyklonal Rabbit-anti-human eNOS bzw. iNOS) 1:1000 (in 1× TBS + 5% Trockenmilchpulver + 0,05% Natriumazid) für 3 – 4 h bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1× TBS wurde die Membran mit den Sekundärantikörper dekoriert (Mouse-anti-Rabbit-IgG; 1:1000 in 1× TBS, 1 h bei RT). Nachdem mehrmals mit 1× TBS gewaschen wurde, erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbanden mittels Chemilumineszenz über die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers unter Benutzung des „Western blotting analysis ECL-Systems“ und anschließender Exposition auf einen Röntgenfilm.

### **3.7.3 Analyse der mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR**

#### **3.7.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus HDMEC erfolgte nach einem Standard-Protokoll für Kulturzellen des „High Pure RNA Isolation Kit“:

In 200 µl PBS wurden 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert, anschließend mit 400 µl Lysepuffer (4,5 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton® X-100 (w/v), pH 6,6) gut vermischt und die Probe folgendermaßen weiterverarbeitet:

1. Probe auf den „High Pure Filter“ eines Filtrationsgefäßes pipettieren
2. Zentrifugation (15 s bei 10000 U/min), Durchlauf verwerfen
3. Pro Probe 90 µl DNase-Inkubationspuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7) mit 10 µl DNase 1 mischen und auf das „High Pure Filter“ pipettieren
4. 15 min Inkubation bei RT
5. Zugabe von 500 µl Waschpuffer 1 (5 M Guanidiniumchlorid, 29 mM Tris-HCl, pH 6,6 in Ethanol)

6. Zentrifugation (15 s bei 10000 U/min), Durchlauf verwerfen, Filter-Tube ins gleiche Auffanggefäß setzen
7. Zugabe von Waschpuffer 2 (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 in Ethanol)
8. Zentrifugation (siehe Punkt 6)
9. Zugabe von 200 µl Waschpuffer 2 und Zentrifugation (3 min bei 13000 U/min)
10. Filter-Tube in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß setzen und RNA durch Zugabe von 50 – 100 µl Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation (1 min bei 10000 U/min) eluieren.

Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der isolierten RNA wurde anhand des Verhältnisses  $OD_{260} : OD_{280}$  überprüft. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde die RNA-Probe bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 3.7.3.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktionsanalyse erfolgte über die „two step“-Methode. Zuerst wurde die isolierte Gesamt-RNA unter Verwendung von „Ready-To Go™ You-Prime First-Strand Beads“ in „full-length“ einzelsträngige copy-DNA (cDNA) umgeschrieben und danach mit spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde die „Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV)“-Reverse Transkriptase verwendet, die in den Beads zusammen mit Puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP und RNase/DNase freiem BSA enthalten war.

Entsprechend der berechneten Nukleinsäure-Konzentration anhand der  $OD_{260}$ -Werte wurde soviel Volumen der Probe entnommen, daß 4 µg in der cDNA-Synthese eingesetzt wurden. Mit DEPC-behandeltem A. bidest wurde auf 32 µl aufgefüllt und die RNA 10 min bei  $65\text{ °C}$  denaturiert. Nach sofortiger Inkubation für 2 min auf Eis wurde die RNA in die Reaktionsgefäße mit den „First-Strand Beads“ pipettiert, 1 µl Random-Primer (pd(N)<sub>6</sub>) zugegeben und nach kurzem Mischen 1 h bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Bis zum Einsatz in den verschiedenen PCR-Reaktionen wurden die cDNA-Proben bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 3.7.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) ist die selektive Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten. Mit Hilfe von zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer), die zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, wird der Bereich zwischen den Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase dupliziert. Durch aufeinanderfolgende Zyklen der Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vervielfachung des gewünschten DNA-Fragments erreicht, da jeder neugebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt wird.

Der Reaktionsansatz für die durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgte nach einem Standardprotokoll:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration im 20 µl Reaktionsansatz</u>
MgCl <sub>2</sub> -Puffer	2 µl	1,5 mM
dNTP	0,4 µl	0,2 mM
fwd Primer	0,5 µl	0,5 µM
rev-Primer	0,5 µl	0,5 µM
DEPC-H <sub>2</sub> O	13,6 µl	-
Taq-Polymerase	0,5 µl	0,625 U/20 µl
cDNA (Template)	3 µl	< 0,2 µg/20 µl

Die Reagenzien wurden in einem 0,7 ml-Reaktionsgefäß vermischt, wobei die Zugabe der Taq-Polymerase und der cDNA zum Schluß erfolgte. Dem schloß sich die Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll an:

Initial-Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	} 35 Zyklen
Annealing	55 °C (eNOS)	45 s	
	63 °C (GAPDH)		
	55 °C (iNOS)		
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	

Die in der PCR eingesetzten Primer (5'→3') basierten auf Veröffentlichungen von Sasa and Michel (1995) und Teng et al. (1998):

eNOS: (for) CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT  
(rev) GTCTCGGAGCCATACAGGATT

iNOS: (for) GAGGAAGTGGGCAGGAGAATG  
(rev) GTAGTAGAAAGGGGACAGGAC

GAPDH: (for) GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTT  
(rev) CACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT.

In Negativ-Kontrollreaktionen wurden anstelle der cDNA-Templates die entsprechenden RNA-Proben (ohne vorherige cDNA-Synthese) eingesetzt.

Als eines der „house keeping genes“ wurde die Expression der GAPDH-mRNA (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in der PCR erfaßt und für die semiquantitative Auswertung herangezogen. Hierzu wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch vermessen und jeweils das Verhältnis eNOS/GAPDH bzw. iNOS/GAPDH bestimmt (Bobadilla et al., 1999).

Nach Beendigung jeder PCR wurden die amplifizierte DNA-Fragmente (eNOS 354 bp, iNOS 294 bp, GAPDH 555 bp) auf 4 °C gekühlt und über eine horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

### 3.7.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückrates bei allen pH-Werten negativ geladen (Ibelgaufs, 1990). Diese Eigenschaft ist die Grundlage der verschiedenen Methoden zur Gelelektrophorese. Sowohl DNA- als auch RNA-Fragmente wandern in einem elektrischen Feld stets in Richtung Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Visualisierbar werden im Gel aufgetrennte Nukleinsäuren durch eine Ethidiumbromidfärbung. Dieses Basenanalogen interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäure-Moleküle, die dann im UV-Licht (254 nm – 300 nm) durch ihre rot-orange Fluoreszenz sichtbar werden.

Die horizontale Agarosegel-Elektrophorese dient der Ergebnisauswertung verschiedener Modifikationen von RNA und DNA (PCR, Restriktion usw.).

Zur Herstellung der Gele (1,5%ig) wurde Agarose in 0,5× TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, abgekühlt, 300 µg/l Ethidiumbromid zugegeben und in die Gelschlitzen gegossen. Nach vollständigem Erhärten des Gels wurden die Proben (10 µl) mit 3 µl Ladepuffer gemischt und jeweils in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Stromversorgungsgerät angeschlossen und das Gel bei 80 V ca. 2 h laufen gelassen. Die einzelnen DNA-Fragmente wurden über die Fluoreszenz anhand der Ethidiumbromid-gefärbten Banden in einem UV-Imager identifiziert.

### 3.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die spezifischen PCR-Produkte wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe eines UV-Tisches aus dem Gel ausgeschnitten, wobei die Banden aufgrund der Ethidiumbromidfärbung sichtbar waren. Diese Agaroseblöckchen wurden durch ein dünnes Filterpapier (Whatman-Papier) in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert (20 sec bei 13000 U/min). Anschließend wurde die aufgefangene DNA (50-100 µl) mit 1/10 Vol 7,5 M Natriumacetat und 3 Vol eiskaltem Ethanol (abs.) über Nacht bei -20 °C gefällt, dann abzentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen.

### 3.7.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977). Diese Methode basiert auf die Ermittlung von DNA-Sequenzen durch kontrollierten Abbruch der DNA-Synthese. Nach einem Denaturierungsschritt der doppelsträngigen DNA schließt sich die Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers an. Dann folgt eine Auffüllreaktion des Einzelstranges über die enzymatische Aktivität der DNA-Polymerase. Eine Limitierung der ddNTP's hat statistische, basenspezifische Kettenabbrüche zur Folge. Bei der nichtradioaktiven Sequenzierung sind diese mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgt eine Anregung der vier Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden über Filter in einen Photomultiplier geleitet und anschließend computergestützt in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt.

Die aus dem Agarosegel eluierte und aufgereinigte DNA wurde in 11 µl A. bidest. aufgenommen und in der anschließenden Sequenzreaktion folgendermaßen eingesetzt:

8 µl „Dye Terminator Sequencing“-Stocklösung  
1 µl Primer (eNOS, iNOS oder GAPDH)  
11 µl DNA (ca. 2 µg).

In einem Thermocycler fand die Sequenzreaktion nach folgendem Programm statt:

1 min 96 °C (Vordenaturierung)	
30 sec 96 °C (Denaturierung)	} 27 Zyklen
15 sec 50 °C (Annaeling)	
4 min 60 C° (Elongation)	
4 min 60 °C (Elongation)	

Nach Reaktionsende wurde die DNA mit 7 µl 2 M Natriumacetat und 68 µl Ethanol (abs.) für 20 min auf Eis gefällt und anschließend für 15 min bei 13000 U/min und

10 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 150 µl 70 %igen Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation luftgetrocknet und in 4 µl Formamid/EDTA-Puffer des Dynamic ET Terminator Cycle Sequence Kites aufgenommen. Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgte auf einem ABI-Sequencer 733 (Applied Biosystems) im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Universität in Halle.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat für Windows. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  betrug. Bei der Auswertung der Daten zur DNA-Syntheserate kam der parameterfreie Kruskal-Wallis Test (One Way Analysis of Variance on Ranks) zur Anwendung, der nicht normalverteilte Grundgesamtheiten miteinander vergleicht. Die Prüfung der signifikanten Unterschiede der übrigen zellbiologischen und molekularbiologischen erfolgte mit dem Mann-Whitney (Rank Sum) Test.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Charakterisierung der isolierten HDMEC**

Der Einsatz von Zellkulturen ist unverzichtbar, um biologische und biochemische Vorgänge zu untersuchen, die Regulation bestimmter Stoffwechselmechanismen zu verstehen und derartige Abläufe unter pathophysiologischen Bedingungen zu klären und mögliche therapeutische Strategien zu entwickeln.

Studien an Endothelzellkulturen liefern einen entscheidenden Beitrag zum besseren Verständnis der vaskulären Biologie (Folkman and Haudenschild, 1980). Das Endothelium ist in seiner Beschaffenheit äußerst heterogen (Hewett and Murray, 1993). Ein erheblicher Anteil der Endothelzellen ist im mikrovaskulären Gefäßsystem präsent. Bei der Isolierung und Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen ist vor allem die Kontamination durch andere Zelltypen, wie Fibroblasten, Perizyten und glatten Muskelzellen ein Problem (Hewett and Murray, 1993, Review). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde eine in der Literatur anerkannte Methode zur Isolierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen etabliert und in der routinemäßigen Gewinnung dieser Zellen zum Zwecke von in vitro Studien angewandt. Hewett and Murray (1993) entwickelten ein Verfahren, bei dem humane mikrovaskuläre Endothelzellen durch eine immunomagnetische Separation mit Hilfe von anti-PECAM-1 (CD31) beschichteten Magnetbeads isoliert wurden.

#### **4.1.1 Zellausbeute und Reinheit der isolierten HDMEC**

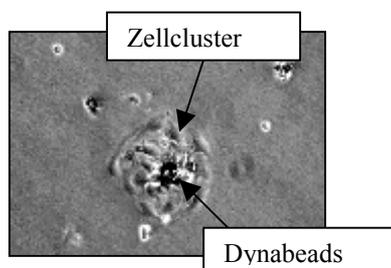
Unter Anwendung der Isolierungsmethode mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads konnten erfolgreich humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen aus Vorhautgewebe gewonnen werden. Die Primärkultur entstand stets aus gepoolten Hautproben, wobei die Altersspanne der Spender zwischen 1 und 10 Jahren lag.

Die Primärkultur der mikrovaskulären Endothelzellen erreichte unter den in Tab. 2 aufgezeigten Wachstumsbedingungen nach 9 bis 11 Tagen eine vollständige Konfluenz.

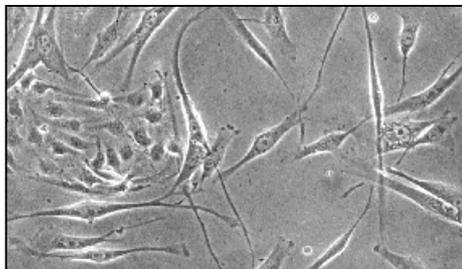
**Tab. 2:** Effizienz der Isolierungsmethode für humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen aus Vorhautgewebe (Hewett and Murray, 1993) unter Verwendung von anti-CD31-beschichteten Dynabeads.

<b>Kulturbedingungen</b>	
Kulturmedium	EGM-MV
Temperatur	37 °C
Luftfeuchtigkeit	90%
CO <sub>2</sub>	5%
Mediumwechsel	jeden 2. Tag
<b>Konfluenz der Primärkultur</b>	9 –11 Tage
<b>Zellausbeute der Primärkultur pro Spenderhaut</b>	1 – 2 Mio
<b>Maximale Subkulturen</b>	6
<b>Optimale Subkultur</b>	2.

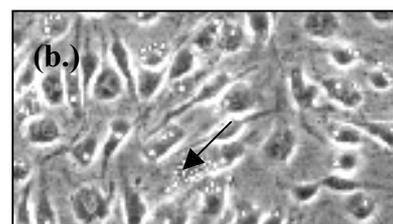
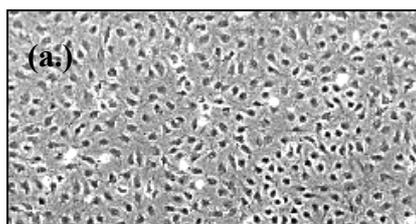
Die Bestimmung der Anzahl der trypsinierten, vereinzelt Zellen der Primärkultur ergab eine Ausbeute von 1 bis 2 Mio Zellen pro Spenderhaut. Die Ausbildung einer adhärennten Monolayer wurde nicht durch die an den „Starterzellen“ haftenden Dynabeads beeinflusst. Am 3. Kulturtag (Abb. 4) war die Ausbildung einzelner Zellcluster mit anhaftenden Dynabeads zu beobachten. Diese, aus teilungsfähigen Zellen bestehenden Cluster vergrößerten sich, so daß schließlich, wie in Abbildung 6 dargestellt, eine konfluente Monolayer entstand. Hierbei konnte ein homogener, „Kopfsteinpflaster-ähnlicher“ Zellrasen beobachtet werden, der charakteristisch für eine Endothelzellkultur ist. Vereinzelt hafteten noch Dynabeads an Zellen.



**Abb. 4:** Primärkultur von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) in EGM-MV, 3 Tage, Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads; Vergrößerung 10 × 20.



**Abb. 5:** Primärkultur einer gemischten Zellpopulation in EGM-MV, 5 Tage, ohne Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads; Vergrößerung  $10 \times 20$ .



**Abb. 6:** Konfluente Monolayer einer Primärkultur von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) in EGM-MV, 10 Tage, Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads; (a.) Vergrößerung  $10 \times 10$  (b.) HDMEC mit anhaftenden Dynabeads (Pfeil), Vergrößerung  $10 \times 40$ .

Versuche zur Subkultivierung mit den isolierten HDMEC lieferten das Ergebnis, daß bis zur 6. Subkultur kultiviert werden konnte, sich aber aufgrund der FACS-Analyse zum von-Willebrand-Faktor, des morphologischen Bildes der Zellen und der nachlassenden Teilungsfähigkeit die 2. Subkultur als optimal erwies.

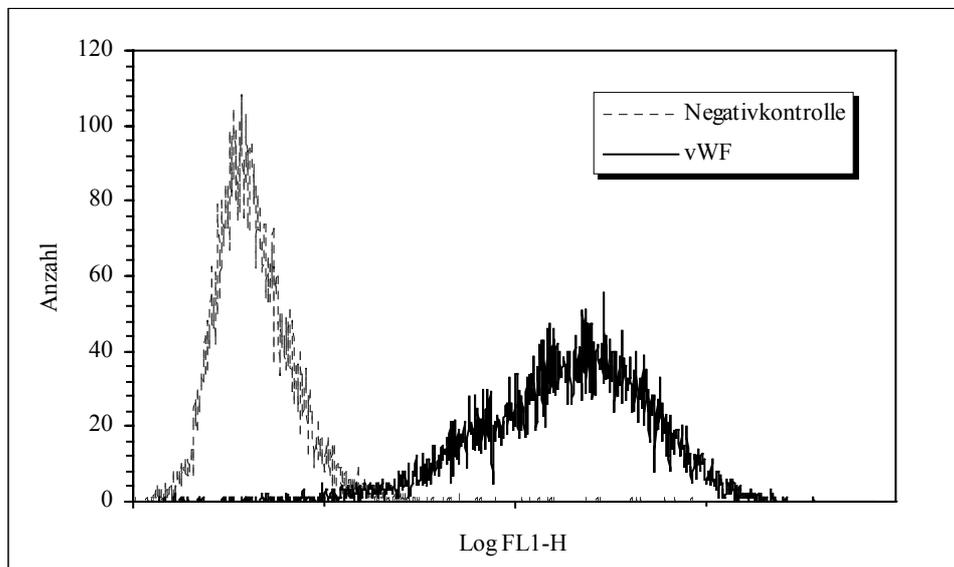
Eine Zellkultur ohne vorherige Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads setzte sich, wie in Abbildung 5 zu sehen, aus verschiedenartigen Zelltypen zusammen. Am 5. Tag der Kultivierung konnte beobachtet werden, daß Fibroblasten-ähnliche Zellen die Endothelzellpopulation überwuchsen. Die wenigen ausgebildeten Endothelzellkomplexe vergrößerten sich nicht.

#### 4.1.2 FACS-Analyse des von Willebrand Faktors (vWF)

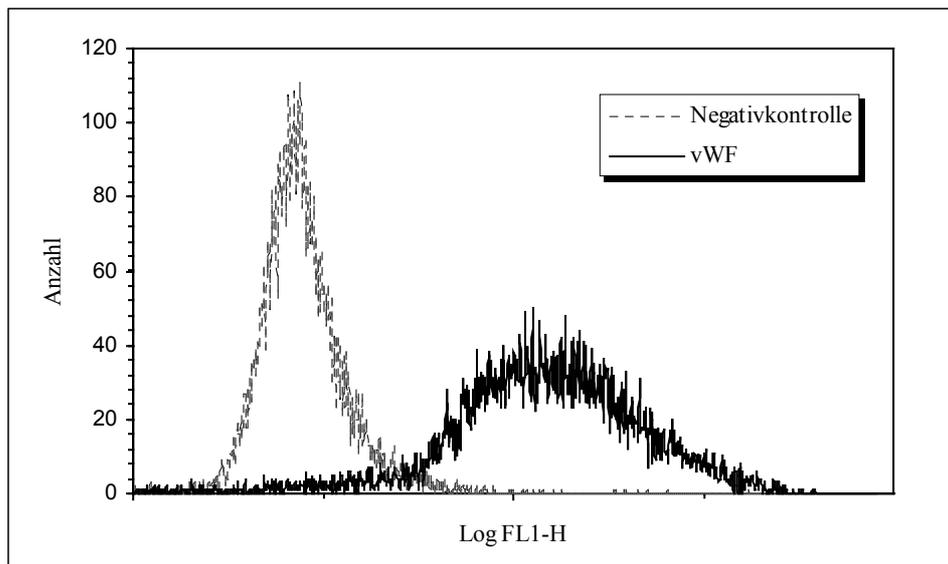
Neben der typischen „cobblestone-like“-Struktur (Kopfsteinpflaster) der Endothelzell-Monolayer als morphologische Charakteristik zählt die Expression des intrazellulär lokalisierten von Willebrand Faktors (vWF) zu einem immunologischen Kriterium, mit dessen Hilfe Endothelzellen identifiziert werden können. Der vWF, der ein 260 kDa großes Glykoprotein darstellt, bildet zusammen mit einem kleineren Eiweiß einen hochmolekularen Komplex, der in den Gerinnungsvorgang involviert ist (Jackson et al., 1990; Kunitakis, 1998; Fukuchi et al., 2001).

Verschiedene Subkulturen von HDMEC, die durch die immunomagnetische Separation mit Hilfe der anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads aus Vorhautgewebe gewonnen wurden, wurden anschließend der flowzytometrischen Analyse zur Bestimmung des vWF zugeführt.

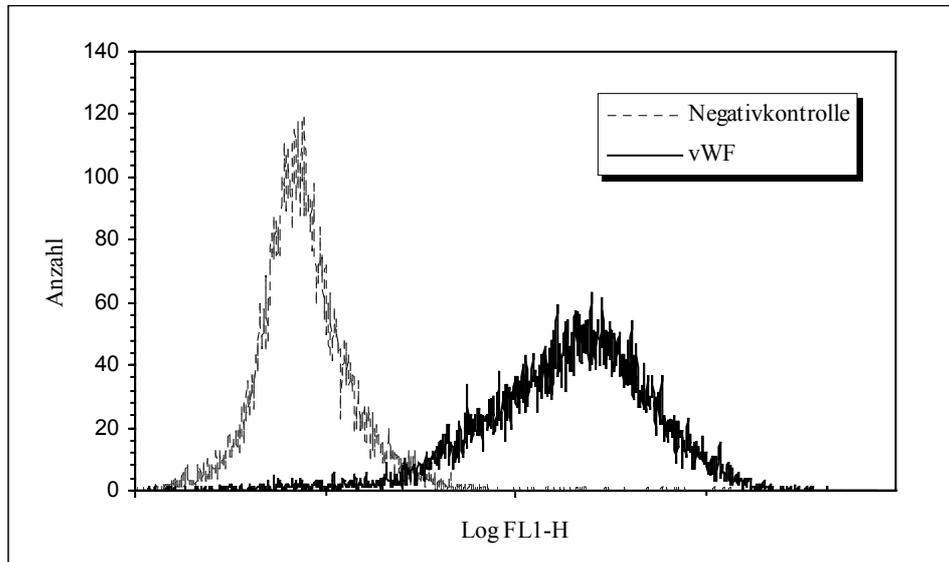
Die Primärkultur der isolierten HDMEC (Abb. 7) zeigte deutlich die Expression des vWF, wobei  $97,08\% \pm 0,8$  der vermessenen Population vWF-positiv waren (Tab.3). Auch in der 1. (Abb. 8) und 2. Passage (Abb. 9) der HDMEC konnte sehr gut dieser Marker nachgewiesen werden. Der Anteil der positiven Zellen ergab sich, wie aus der Tab. 3 zu entnehmen, aus  $91,41\% \pm 3,72$  bzw.  $95,14\% \pm 2,78$  der vermessenen Gesamtpopulation.



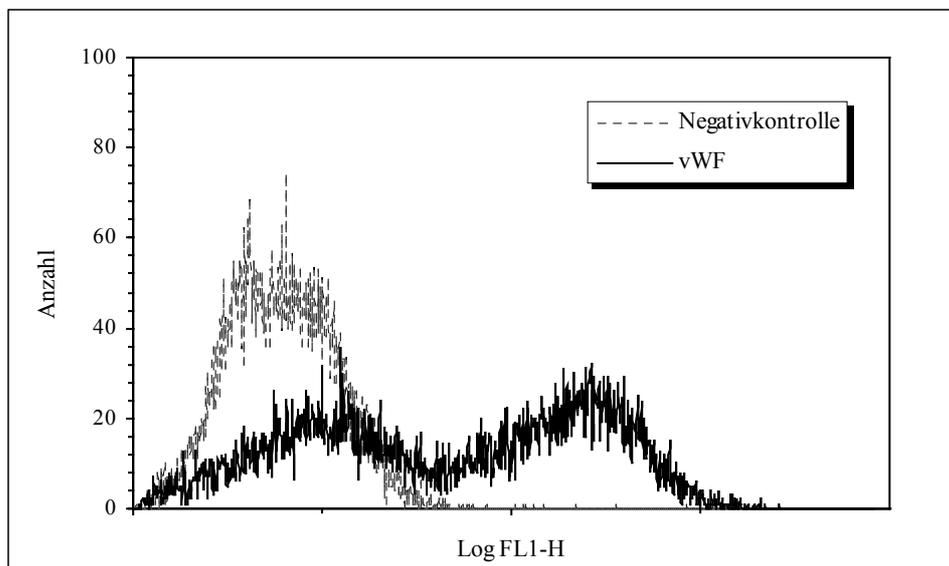
**Abb. 7:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an einer Primärkultur von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 10 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC.



**Abb. 8:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an der 1. Passage von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 7 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC.

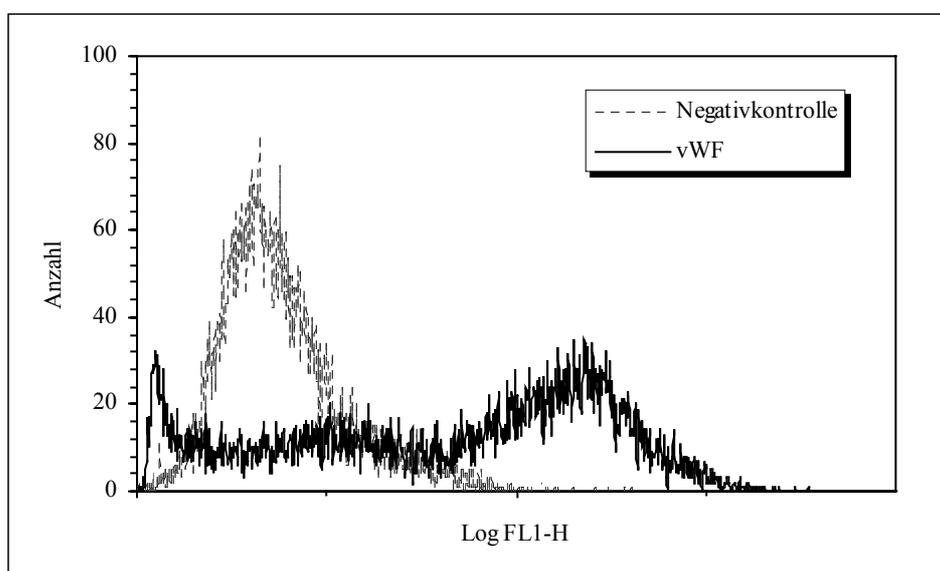


**Abb. 9:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an der 2. Passage von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 7 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC.



**Abb. 10:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an der 3. Passage von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 7 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC.

Im Vergleich zur Endothelzellkultur, in der zuvor die Endothelzellen mit den Dynabeads separiert wurden, sollte eine Kultur getestet werden, die eine Mischzellkultur darstellte. Hierbei wurde nur bei  $48,76\% \pm 4,9$  der Zellen ein positives vWF-Signal erhalten (Abb. 11). Ähnlich waren die Daten der FACS-Analyse der 3. Passage der HDMEC. Nur in  $53,41\% \pm 2,00$  der vermessenen Zellen konnte die Expression des vWF nachgewiesen werden (Abb. 10).



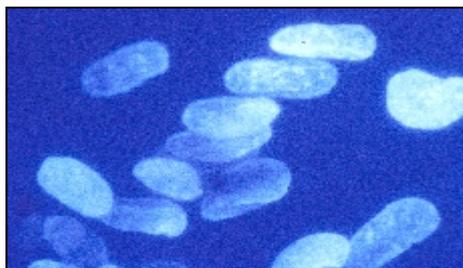
**Abb. 11:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an einer Primärkultur einer Mischzellpopulation, nach 10 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF –FITC.

**Tab. 3:** Quantitative Bestimmung des Anteils der vWF-positiven Zellen bezüglich der vermessenen Gesamtpopulation in den verschiedenen Zellkulturen; Methode: Flowzytometrische Analyse mit anti-human vWF-FITC; n = 3.

Anteil der vWF-positiven Zellen in der vermessenen Gesamtpopulation [%]				
<u>Primärkultur</u> gemischte Zellpopulation	<u>Primärkultur</u> HDMEC	<u>1.Passage</u> HDMEC	<u>2.Passage</u> HDMEC	<u>3.Passage</u> HDMEC
$48,76 \pm 4,91$	$97,08 \pm 0,83$	$91,41 \pm 3,72$	$95,14 \pm 2,78$	$53,41 \pm 2,00$

### 4.1.3 Nachweis der Mycoplasmenfreiheit

Die verschiedenen Subkulturen der isolierten HDMEC wurden stichprobenartig auf mögliche Mycoplasmenkontaminationen untersucht. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 wurde die DNA in den Zellkernen gefärbt und durch Anregung mit UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Die Abbildung 12 zeigt repräsentativ eine Mycoplasmen-freie Endothelzellkultur, auf der die fluoreszierenden Zellkerne dargestellt sind. Mycoplasmen-DNA, die als kleine, fluoreszierende Punkte zwischen den Zellkernen sichtbar wären, konnten nicht nachgewiesen werden.

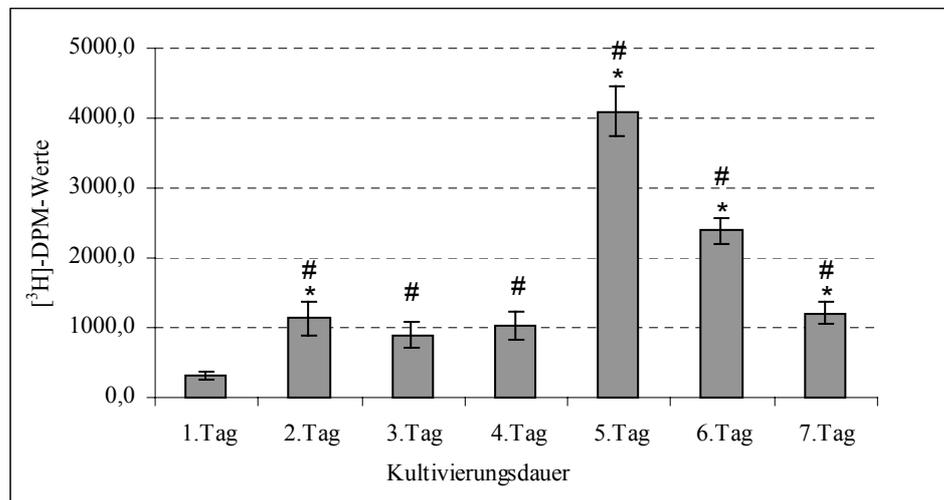


**Abb. 12:** Mycoplasmen-freie Kultur von HDMEC, 1. Passage, nach 3 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV, Darstellung der fluoreszierenden Zellkerne nach DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258.

### 4.1.4 Wachstumsverhalten der isolierten HDMEC

Um die isolierten HDMEC weiter zu charakterisieren und zu klären, welcher Zeitpunkt der Zellkultur optimal für beispielsweise Vitalitäts- bzw. Toxizitätsexperimente oder Enzymaktivitätsbestimmungen sind, wurde untersucht, wie sich die Teilungsfähigkeit der Zellen gestaltete. Hierfür wurde das Proliferationsverhalten der isolierten HDMEC anhand der DNA-Syntheseleistung über den Einbau von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]Thymidin während der Synthesephase des Zellzyklusses näher untersucht und mit einer Kultur aus kommerziell erhältlichen HDMEC verglichen. Es wurde sichergestellt, daß bei beiden Versuchsansätzen identische Kulturbedingungen herrschten. Es wurde jeweils die 2. Subkultur verwendet. Bereits 24 h nach Zellaussaat erfolgte die erste

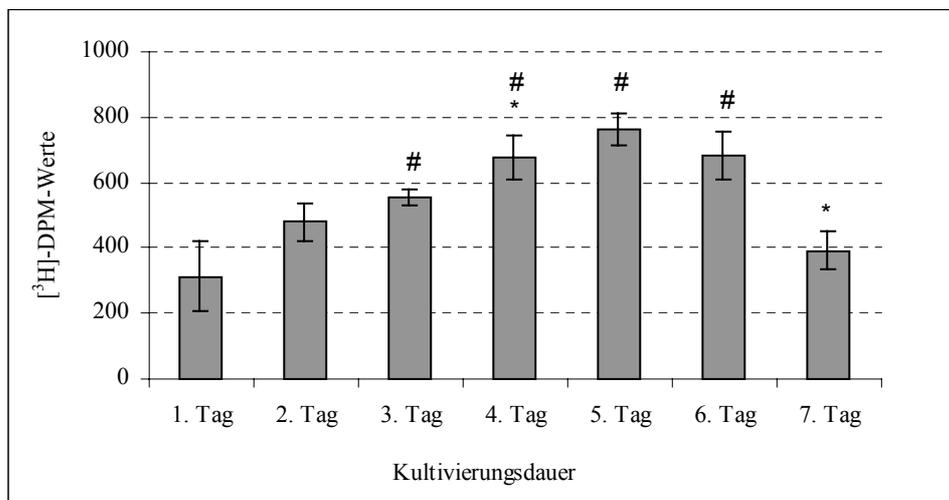
Messung (= 1.Tag). Ein Mediumwechsel fand bis zum 7. Tag nicht statt, um Wachstumsschübe, verursacht durch das Zuführen neuer Nährstoffe, zu vermeiden.



**Abb. 13:** Bestimmung der DNA-Syntheseleistung in isolierten HDMEC, 7 Tage Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zum Vortag, # im Vergleich zum 1.Tag;  $n = 24$ .

Die Abbildung 13 stellt die Ergebnisse zur DNA-Syntheseleistung in isolierten HDMEC dar. Am ersten Tag nach Zellaussaat war die Anzahl an teilungsfähigen Zellen noch gering, so daß wenig [<sup>3</sup>H]Thymidin eingebaut wurde. Am 2. Tag verdreifachten sich die DPM-Werte, wobei ähnliche Daten am 3. und 4. Tag erhalten wurden. Der 5. Tag stellte den Höhepunkt der DNA-Syntheseleistung dar. Die [<sup>3</sup>H]-DPM-Werte waren etwa viermal so hoch wie am Vortag. Bereits am folgenden Tag fielen die Werte stark ab. Am 7. Tag wurden ähnliche Werte verglichen mit den Tagen 2 – 4 erreicht.

Eine ähnliche Tendenz der DNA-Syntheseleistung wurde bei den kommerziell erhältlichen HDMEC beobachtet (Abb. 14). Auch hier stellt der 5. Tag ein Proliferationsmaximum dar. Allerdings ist sowohl der Anstieg bis zum 5. Tag als auch der danach einsetzende Abfall durch eher allmähliche Änderungen der DPM-Werte gekennzeichnet.



**Abb. 14:** Untersuchung der DNA-Syntheseleistung in kommerziell erhältlichen HDMEC, 7 Tage Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zum Vortag, # im Vergleich zum 1.Tag;  $n = 12$ .

#### 4.1.5 Bewertung der HDMEC-Isolation

Die Zellen des Gefäßsystems spielen eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse, wie z.B. der Immunantwort, der Wundheilung, Entzündung, Tumormetastasierung, der Angiogenese u.v.a. (Ades et al., 1992; Detmar et al., 1992; Frank et al., 1996; Gupta et al., 1997; Fritsch, 1998; Richard et al., 1998; Lee et al., 1999). Zur Klärung solcher Prozesse werden häufig Studien an Zellkulturen aus **makrovaskulären** Endothelzellen durchgeführt, die relativ einfach und preiswert aus der Nabelschnur gewonnen und kultiviert werden können (Ades et al., 1992; Swerlick and Lawley, 1993). Dagegen steht allerdings die Tatsache, daß sich die meisten pathophysiologischen Ereignisse auf der Ebene **mikrovaskulärer** Endothelzellen abspielen. Bei Entzündungsprozessen beteiligte Zellen, wie Lymphozyten, Neutrophile oder Monozyten müssen, bevor eine Reaktion im parenchymalen Gewebe verschiedener Organe möglich ist, zuerst mit Zellen des mikrovaskulären Gefäßsystems interagieren (Swerlick et al., 1991; Marui et al., 1993). Hinzu kommt, daß anhand einer Vielzahl von Studien nachgewiesen wurde, daß Endothelzellen der Makro- und Mikrogefäße unterschiedlich stark in solche

pathophysiologischen Prozesse involviert sind. Das betrifft unter anderem die Prostaglandinsekretion, die Expression, Funktion und Regulation der Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules = CAM) auf der Zelloberfläche (Swerlick et al., 1991; Swerlick et al., 1992; Hewett and Murray, Review 1993; Swerlick and Lawley, 1993; Heckmann et al., 1994; Sepp et al., 1994; Swerlick et al., 1994; Frank et al., 1996; Gille et al., 1996; Kluger et al., 1996; Swerlick et al., 1996; Gille et al., 1997; Mason et al., 1997; Richard et al., 1998; Lindsey et al., 2000). Somit stellt die Kultur aus mikrovaskulären Endothelzellen verglichen mit einer Kultur aus makrovaskulären Endothelzellen ein realitätsnahes und bevorzugtes Modell zur Studie solcher Vorgänge dar (Ades et al., 1992; Hewett and Murray, 1993; Gupta et al., 1997). Von mehreren Arbeitsgruppen wurden verschiedene Methoden zur Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen entwickelt. In Anlehnung an die Veröffentlichung von Hewett and Murray (1993) wurden in der vorliegenden Untersuchungen anti-CD31-beschichtete Dynabeads für eine immunomagnetische Separation zur Gewinnung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen aus Hautgewebe eingesetzt. Hierbei konnten homogene Kulturen aus humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen isoliert und erfolgreich subkultiviert werden. Ein Vergleich des Phänotyps einer solchen Zellkultur mit denen von anderen Autoren (Jackson et al., 1990; Ruszczak et al., 1990; Ades et al., 1992; Richard et al., 1998) ergibt ein identisches mikroskopisches Bild. Sehr heterogen war dagegen die Zellkultur, die zuvor nicht mit anti-CD31-beschichteten Dynabeads inkubiert wurde. Die Identifizierung der verschiedenartigen Zelltypen einer solchen Mischkultur wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es ist wahrscheinlich, daß es sich bei einer solchen Mischzellpopulation um dermale Fibroblasten, Perizyten und/oder glatten Muskelzellen handelte (Chan et al., 1998). Die Separation der HDMEC über den Zelloberflächenmarker PECAM-1 stellte eine effiziente Methode zur Isolierung von HDMEC dar. PECAM-1 (CD31) ist ein hoch spezifischer Marker für Endothelzellen. Er ist ein 130 kDa Glykoprotein und wird konstitutiv von Endothelzellen (ca.  $10^6$  Moleküle/Zelle) und einigen anderen Zellen, wie Monozyten und Granulozyten exprimiert. Ebenso ist er in Zellen makrovaskulärer Gefäße (HUVEC) zu finden. Im Vergleich zum *Ulex europaeus* Agglutinin-1 (UEA-1) Lektin, das häufig als Marker für die Identifizierung von Endothelzellen benutzt wird, wird CD31 nicht auf der Oberfläche von anderen epithelialen und mesothelialen Zellen

exprimiert (Jackson et al., 1990; Hewett and Murray, 1993; Hewett and Murray, Review, 1993). Folglich zeigt CD31 als Marker eine höhere Spezifität für Endothelzellen. Die Autoren Gupta et al. (1997) beschreiben eine weitere Methode zur Isolierung von HDMEC aus Vorhautgewebe. Hierbei wurden Gewebekulturplatten, beschichtet mit einem EN4-Antikörper eingesetzt. Die Effizienz ist mit der CD31-Methode vergleichbar. Ein eher aufwendiges Verfahren zur Isolierung von HDMEC ist die Aufreinigung über einen Percollgradienten, wobei die Zellsuspension in eine Percoll-Lösung gegeben wird und nach anschließender Zentrifugation sich die HDMEC aufgrund ihrer spezifischen Dichte in einem bestimmten Bereich des Percollgradienten akkumulieren (Ruszczak et al., 1990; Detmar et al., 1992; Lee et al., 1992; Lynn et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnten die isolierten HDMEC bis zur 6. Passage subkultiviert werden (siehe Tab. 2), wobei sich allerdings die 2. Passage als optimale Kultur für weiterführende Experimente erwies. Eine weitaus höhere Passagenanzahl (bis zu 10) erreichten andere Arbeitsgruppen (Jackson et al., 1990; Ades et al., 1992; Lee et al., 1992; Lynn et al., 1994). Das morphologische Bild unserer Zellkultur, die nachlassende Teilungsfähigkeit und die immunologische Charakterisierung anhand des von-Willebrand-Faktor erlaubten nicht eine solche länger andauernde Subkultivierung.

Die Identifizierung der HDMEC kann, ähnlich der Isolierung, über verschiedene zellspezifische Marker erfolgen. Die hier aus der Vorhaut isolierten HDMEC wurden durch den Einsatz der anti-CD31-beschichteten Dynabeads bereits selektiert. Ferner war die Kultur durch die Endothelzell-typische „cobblestone“-Morphologie gekennzeichnet. Der intrazellulär lokalisierte von-Willebrand-Faktor als spezifischer Marker für Endothelzellen konnte mittels FACS-Analyse in der Primär- (97,08%), in der 1. (91,41%) und 2. (95,14%) Subkultur nachgewiesen werden. In Cai et al. (1992), Heckmann et al. (1994) und Chan et al. (1998) waren ebenfalls ca. 95% vWF positiv. Der Anteil der vWF-positiven Zellen verringerte sich mit steigender Passagenzahl der HDMEC und bei einer Kultur nach fehlender Selektion durch anti-CD31-beschichtete Dynabeads. Offenbar verlieren die isolierten HDMEC im Laufe einer Langzeitkultur die Fähigkeit, bestimmte Markerproteine zu exprimieren. Außerdem wurde während der Zellisolierungsversuche beobachtet, daß bei nachlassendem Proliferationsverhalten sich die Morphologie der Zellkultur änderte. Aus diesem Grund wurden für

zellphysiologische Untersuchungen nur Kulturen eingesetzt, die aus proliferierenden Endothelzellen bestanden.

Neben dem vWF als Endothelzell-spezifischen Marker haben Autoren die Expression anderer Marker als Identifizierungsmerkmale herangezogen, beispielsweise den Rezeptor für das fluoreszenzmarkierte acetylierte „low-density lipoprotein“ (Dil-Ac-LDL), PECAM-1 (CD31), E-Selektin (ELAM-1), Angiotensin-spaltendes Enzym (ACE), CD36, UEA-1 (George et al., Mason et al., 1996; Heckmann et al., 1997).

Über das Proliferationsverhalten kann basierend auf die Daten zum [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau ausgesagt werden, daß die DNA-Syntheseleistung in den isolierten Endothelzellen durch eine anfängliche Lag-Phase, die bis zu 4 Tage andauern kann, dann durch eine sprunghafte Steigerung gekennzeichnet war.

Die Ergebnisse der Isolierung und Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen aus Vorhautgewebe lassen die Schlussfolgerung zu, daß das in dieser Arbeit angewandte immunomagnetische Verfahren unter Verwendung von anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads geeignet ist, eine homogene, reine und subkultivierbare Endothelzellkultur zu erhalten. Die Methode ist wenig zeit- und kostenaufwendig und kann bei veränderten Aufgabenstellungen beispielsweise durch die Verwendung anderer Antikörper modifiziert und somit auf andere Zelltypen und Markerproteine ausgerichtet werden.

## **4.2 Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Substanzen auf den L-Arginin/NO-Stoffwechsel in HDMEC**

Ziel der Untersuchungen mit den hier eingesetzten physiologisch relevanten Verbindungen war zu klären, inwieweit eine Modulation der L-Arginin-vermittelten NO-Generierung in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen hervorgerufen wird.

Zunächst wurde untersucht, welchen Effekt die Testsubstanzen auf die Teilungs- bzw. Lebensfähigkeit der HDMEC ausüben. Hierfür wurden nach den verschiedenen Inkubationszeiträumen (24 h, 48 h und 72 h) die Zellen trypsinisiert und die Zellanzahl bestimmt.

Die Beeinflussung der NO-Generierung wurde über eine Aktivitätsbestimmung untersucht, wobei die Freisetzung eines der Endprodukte (NO) der NOS-vermittelten Oxidationsreaktion gemessen wurde. Mit Hilfe der Griess-Reaktion konnte der Gehalt an Nitrit, einem stabilen NO-Oxidationsprodukt, im Kulturmedium spektrophotometrisch bestimmt werden.

Zu den getesteten Verbindungen zählten zum einen die kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin. Sie werden vorwiegend über den kationischen Aminosäuretransporter ( $\gamma^+$ -Transporter) in die Zelle transportiert. Zum anderen wurde untersucht, ob durch eine Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und durch Zugabe des essentiellen Cofaktors Tetrahydrobiopterin die NO-Freisetzung, ergo die Aktivität der NO-Synthase, moduliert werden kann.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die L-Arginin-enthaltenen Dipeptide L-Arginyl-Arginin (L-Arg-Arg) und L-Arginyl-Leucin (L-Arg-Leu) einen Effekt auf die Nitritakkumulation der HDMEC zeigen.

### **4.2.1 Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die Vitalität**

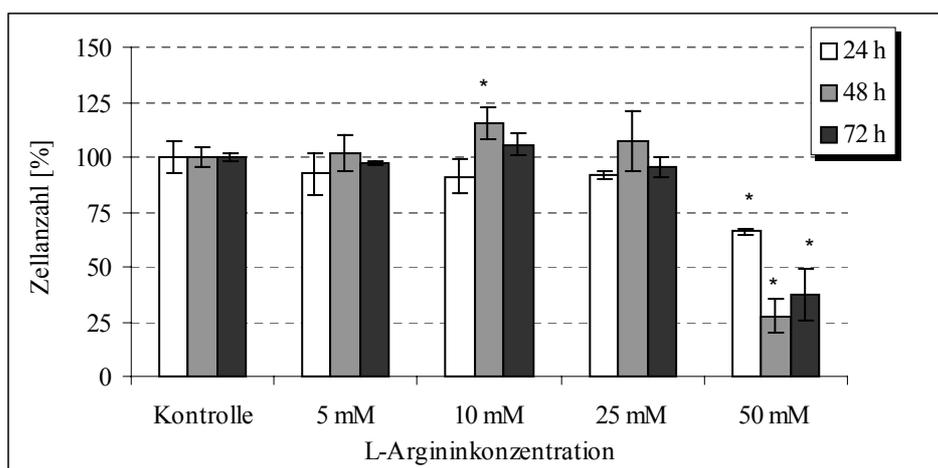
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen wurden in EGM-MV ca. 3 Tage in Kulturschälchen ( $\varnothing$  60 mm) kultiviert, anschließend das Medium durch phenolrotfreies EGM-MV (ohne Hydrocortison und Rinderhirnextrakt) ersetzt und mit den

verschiedenen Substanzen für eine Zeitdauer von 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Durch Bestimmung der Anzahl der trypsinierten Zellen mittels des Zellcoulters konnte der Einfluß der eingesetzten Substanzen auf die Teilungsfähigkeit von HDMEC untersucht werden.

#### 4.2.1.1 Einfluß von L-Arginin

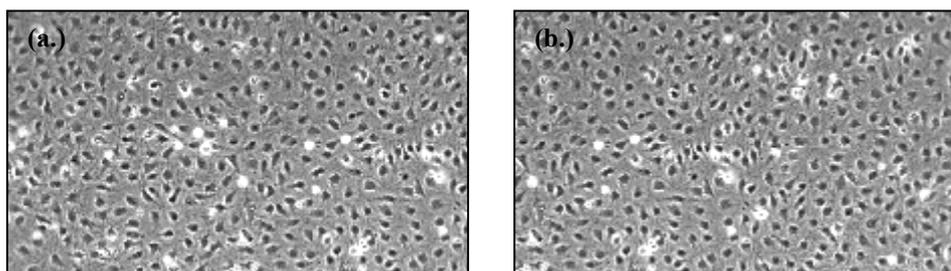
Die kationische Aminosäure L-Arginin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,5 mM–50 mM als Endkonzentrationen getestet. Das verwendete EGM-MV enthielt 0,5 mM L-Arginin (Kontrolle).

Nach einer 24stündigen Behandlung mit L-Arginin wirkten 50 mM toxisch (Abb. 15). Die Zellanzahl reduzierte sich auf ca. 60% im Vergleich zur Kontrolle. Dieser toxische Effekt war nach 48 h und 72 h weitaus deutlicher. Geringere Konzentrationen, wie 5 mM, 10 mM und 25 mM zeigten selbst bei 72stündiger Inkubation keinen hemmenden Einfluß auf die Anzahl teilungsfähiger Endothelzellen. Bei 10 mM (48 h) wurde ein leichter Anstieg (auf 115%) beobachtet.

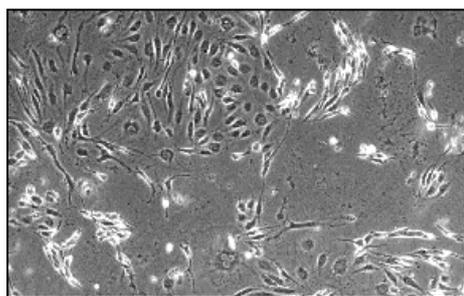


**Abb. 15:** Einfluß von L-Arginin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin im Medium);  $n = 3$ .

Der Einfluss der verschiedenen L-Argininkonzentrationen kann außerdem anhand der veränderten Zellmorphologie aufgezeigt werden. Nach der Supplementierung von 5, 10 und 25 mM L-Arginin war ein konfluenter intakter Zellrasen erkennbar. Diese Beobachtung war nach allen Inkubationszeiten identisch. Die Abbildungen 16a und 16b, auf denen eine mikroskopische Darstellung einer Kontroll- und einer 10 mM-behandelten Zellkultur abgebildet sind, zeigen repräsentativ die Verträglichkeit der HDMEC-Kultur gegenüber L-Arginin. Der schädigende Effekt von 50 mM L-Arginin, der bereits nach 24 h auftrat und nach 72 h besonders deutlich war, ist in der Abbildung 17 zu sehen.



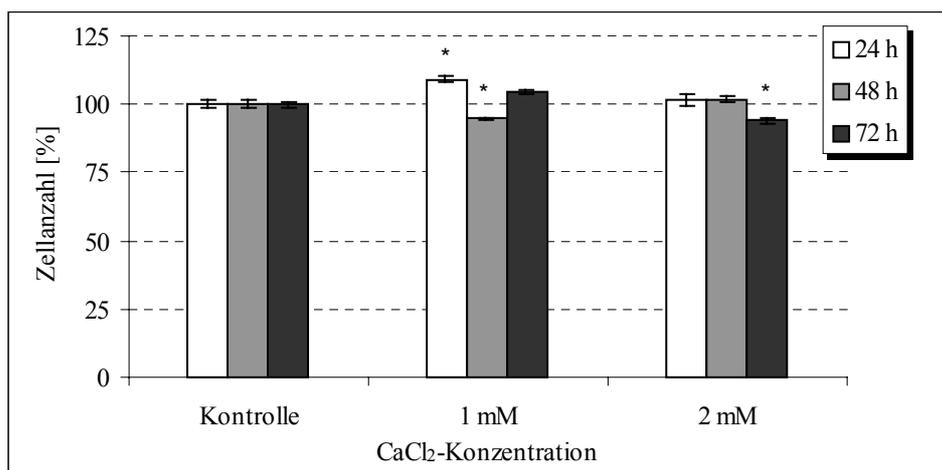
**Abb. 16:** HDMEC nach 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV mit (a.) 0,5 mM L-Arginin, (b.) 10 mM L-Arginin; Vergrößerung  $10 \times 10$ .



**Abb. 17:** HDMEC nach 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV mit 50 mM L-Arginin; Vergrößerung  $10 \times 10$ .

#### 4.2.1.2 Einfluß von $\text{Ca}^{2+}$ Ionen

Durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  wurden dem Kulturmedium freie  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen zugesetzt und somit die extrazelluläre Konzentration erhöht. Wie aus der Abbildung 18 zu entnehmen, trat ein geringer proliferationssteigernder Effekt bei 1 mM/ 24 h auf (109% vs. Kontrolle). Nach 48 h/ 1 mM und 72 h/ 2 mM kam es zu einer geringfügigen Reduktion der Zellanzahl. Eine stärkere Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen durch Supplementation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde über den gesamten Zeitraum nicht beobachtet.

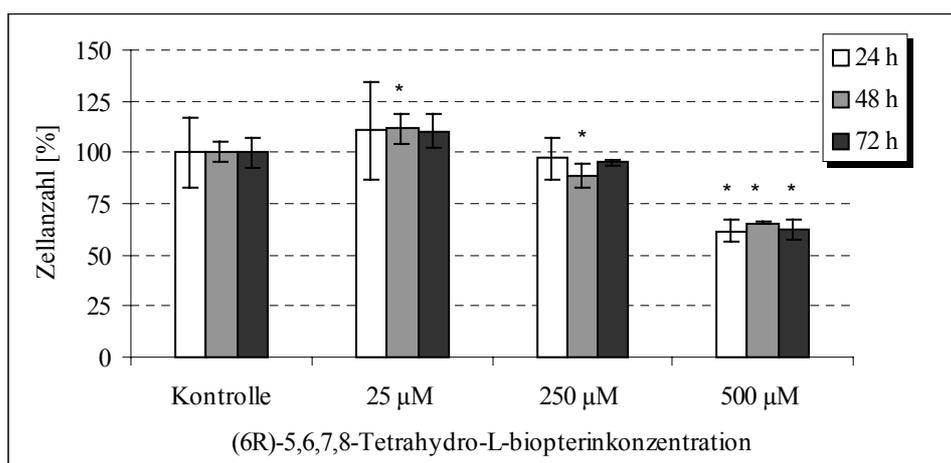


**Abb. 18:** Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen ( $\text{CaCl}_2$ ) auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.1.3 Einfluß von Tetrahydrobiopterin

Als weitere biologisch wirksame Verbindung wurde Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), ein essentieller Cofaktor der NO-Synthase untersucht. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse zum Einfluß von BH<sub>4</sub> auf die Lebendzellanzahl von HDMEC.

Eine Konzentration von 25 µM (24 h) hatte einen geringfügigen positiven Effekt auf HDMEC. Eine Behandlung der Endothelzellen mit höheren BH<sub>4</sub>-Konzentrationen rief eine Zellanzahlreduzierung hervor. So konnten bei 500 µM nur noch ca. 60% der Zellanzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt werden. Dieser Befund war nach 24 h, 48 h und 72 h identisch.

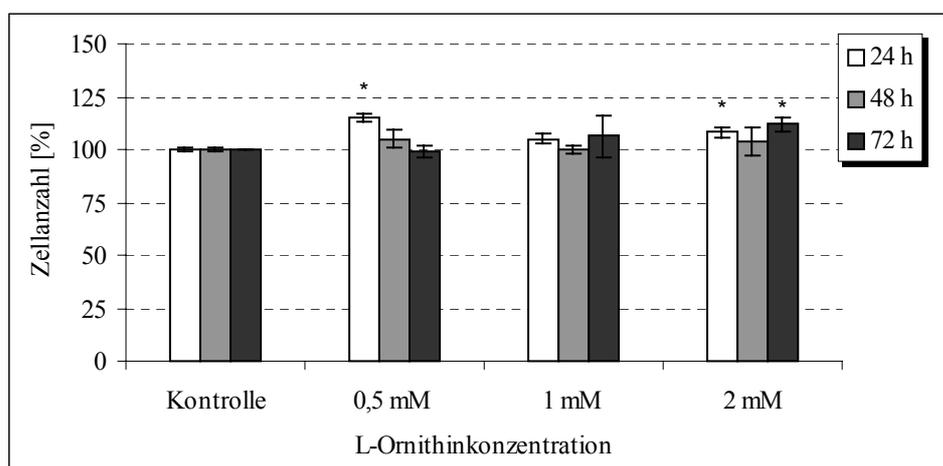


**Abb. 19:** Einfluß von (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (BH<sub>4</sub>) auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; n = 3.

#### 4.2.1.4 Einfluß von L-Ornithin

Der Einfluß von L-Ornithin auf die Proliferation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen ist in Abbildung 20 dargestellt.

Die kationische Aminosäure wirkte in keiner der verwendeten Konzentrationen toxisch auf die HDMEC. Es kam zu keiner Reduktion der Zellanzahl. Vielmehr wurde nach einer 24stündigen Inkubation mit den Konzentrationen 0,5 mM und 2 mM (114% bzw. 108% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) eine leichte Erhöhung der Zellanzahl beobachtet. Dies trat ebenfalls nach 72 h bei 2 mM L-Ornithin ein (111%).

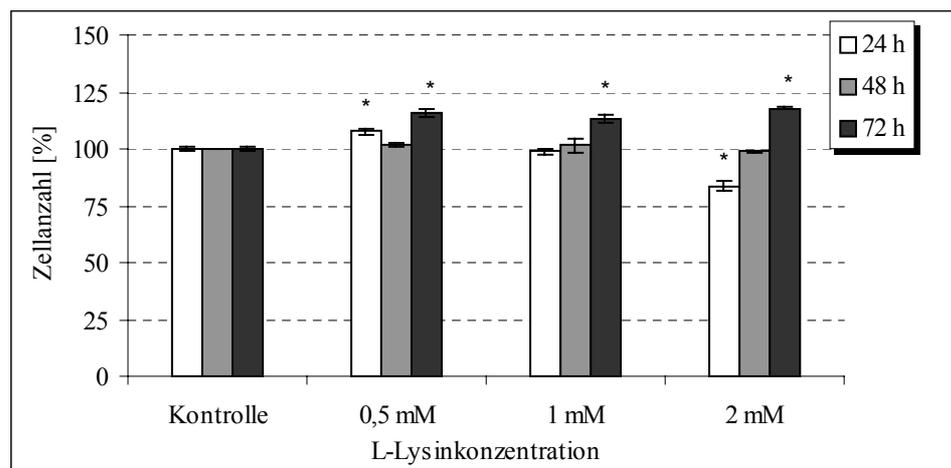


**Abb. 20:** Einfluß von L-Ornithin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.1.5 Einfluß von L-Lysin

Neben L-Ornithin wurde L-Lysin als weitere Aminosäure getestet, die ebenfalls über das  $\gamma^+$ -Transportsystem von Endothelzellen aufgenommen wird.

Die Abbildung 21 zeigt, daß eine Konzentration von 0,5 mM nach 24 h (107%) und nach 72 h (115%) zu einer Steigerung der Lebendzellanzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte. Ebenfalls einen solchen positiven Effekt hatten 1 mM/ 72 h (115%) und 2 mM/ 72 h (117%). Die Inkubation mit 2 mM für 24 h zog eine Verringerung (83%) der teilungsfähigen Zellen nach sich.

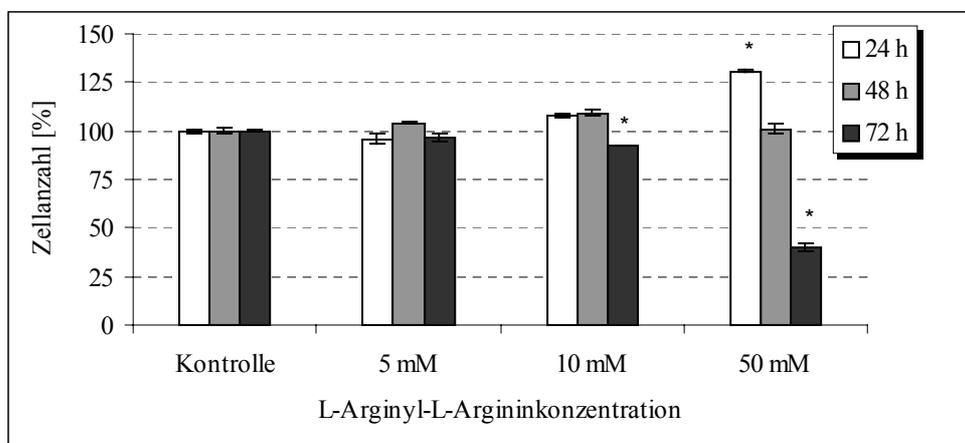


**Abb. 21:** Einfluß von L-Lysin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.1.6 Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Arginin

Um erste Hinweise darauf zu erhalten, wie sich die Aufnahmefähigkeit humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen für ein L-Arginin-enhaltenes Dipeptides gestaltet und inwieweit das  $\gamma^+$ -Transportsystem darin involviert sein könnte, wurden die Zellen mit L-Arginyl-L-Arginin (L-Arg-Arg) behandelt. Die Inkubation erfolgte wie in den vorherigen Experimenten für 24, 48 und 72 h und in dem Konzentrationsbereich, in dem bereits L-Arginin eingesetzt wurde.

Wie in der Abbildung 22 ersichtlich, zog eine Inkubation mit 10 mM/ 72 h eine geringe (92%) und 50 mM/ 72 h (40%) eine starke Zellanzahlreduktion nach sich. Wurden 50 mM für 24 h zu den Endothelzellen gegeben, erhöhte sich die Zellanzahl auf 130%. Keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle wurde bei 5 mM L-Arg-Arg nach 24, 48, 72 h und bei 50 mM nach 48 h beobachtet.

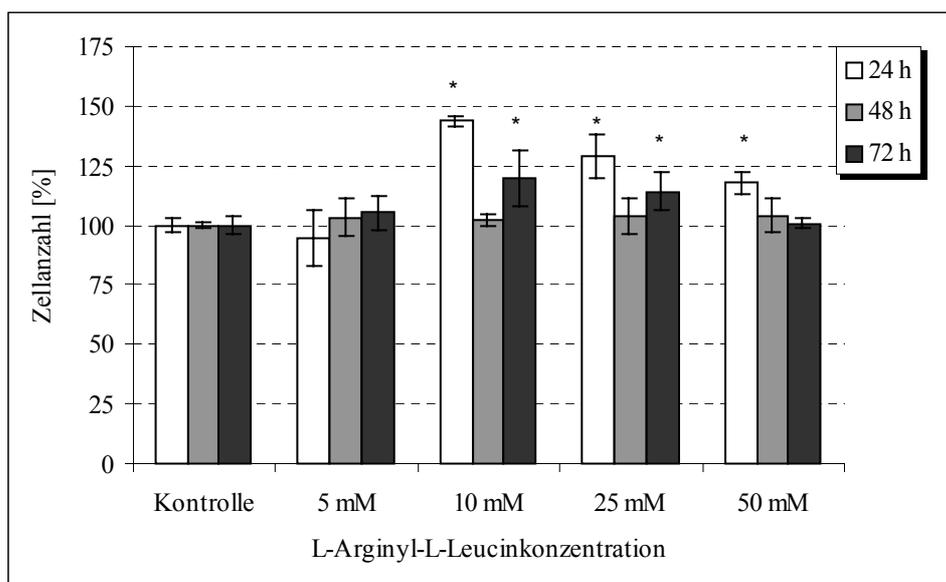


**Abb. 22:** Einfluß von L-Arginyl-L-Arginin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.1.7 Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Leucin

Neben dem Dipeptid L-Arginyl-L-Arginin wurde L-Arginyl-L-Leucin (L-Arg-Leu) an HDMEC getestet (Abb. 23).

Eine toxische Wirkung trat über den gesamten Versuchszeitraum bei keiner der verwendeten Konzentrationen auf. Eine 24stündige Inkubation führte ab 10 mM zu einer Erhöhung (143%) der Zellanzahl. Eine ähnliche Tendenz wurde bei 25 mM (128%) und bei 50 mM (117%) beobachtet. Die Werte für 10 mM/ 72 h und 25 mM/ 72 h waren ebenfalls gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht.

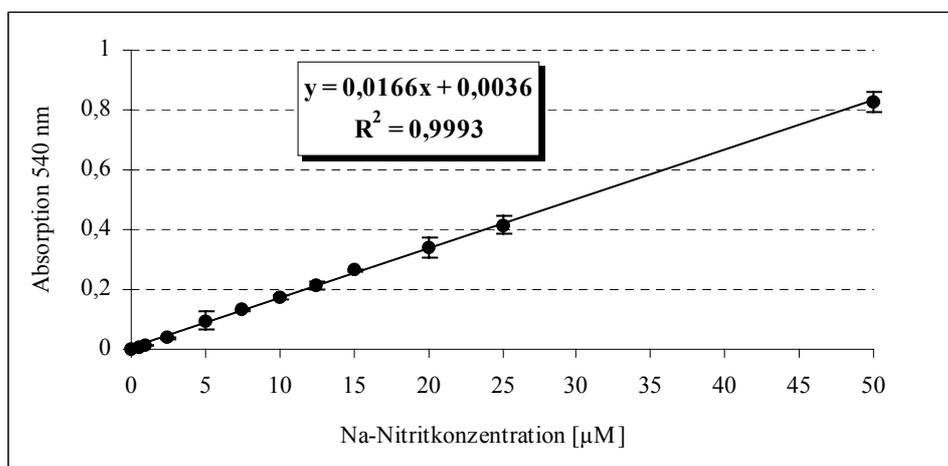


**Abb. 23:** Einfluß von L-Arginyl-L-Leucin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.2 NO-Freisetzung in HDMEC

Wie bereits zu Beginn im Abschnitt 4.2 beschrieben, wurde die NO-Synthase-Aktivität über die Akkumulation von Nitrit, einem stabilen Oxidationsprodukt von NO, mit der Griess-Reaktion im zellfreien Kulturüberstand nachgewiesen. Die Berechnung der Nitritkonzentration erfolgte anhand einer Konzentrationsreihe mit  $\text{NaNO}_2$ , wobei die verschiedenen Konzentrationen in phenolrotfreiem EGM-MV vorlagen (Abb. 24).

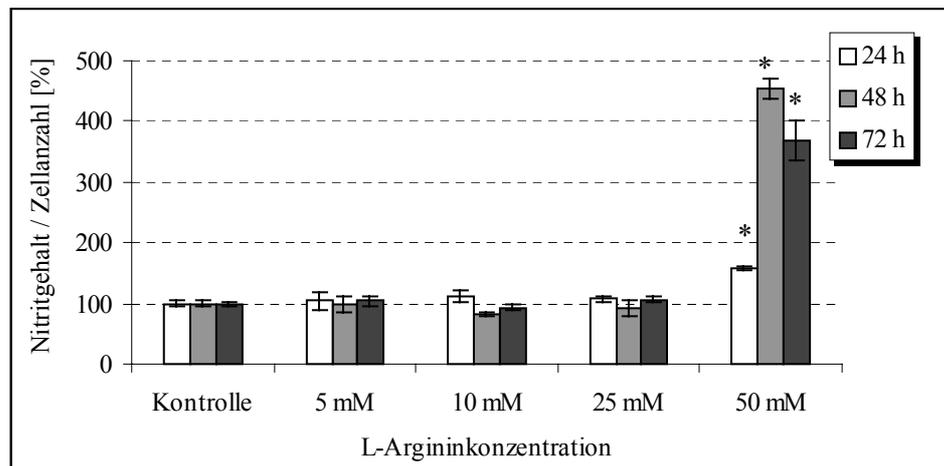
Es wurde ein Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0,9993$  errechnet. Der Reaktionsansatz und die Absorptionsmessung bei 540 nm erfolgte in 96er Mikrotiterplatten. Sowohl für die Eichgerade als auch für die Berechnung der einzelnen Proben wurde jeweils die Eigenabsorption des Mediums vom Messwert subtrahiert. Um Ergebnisse der verschiedenen Testansätze einzelner Komplexe miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Nitritkonzentrationen prozentual zur Kontrolle und bezogen auf die Zellanzahl angegeben.



**Abb. 24:** Konzentrationsreihe mit  $\text{NaNO}_2$  in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Griess-Reaktion nach Green et al., 1982;  $n = 6$ .

#### 4.2.2.1 Einfluß von L-Arginin

Durch Zufuhr von L-Arginin, dem natürlichen Substrat der NO-Synthase, konnte bis zu einer Konzentration von 25 mM keine Steigerung des Nitritgehaltes im Kulturmedium der HDMEC im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM L-Arginin im EGM-MV) nachgewiesen werden. Dieser Befund ist in Abbildung 25 dargestellt. Nach Applikation von 50 mM L-Arginin, wurde eine Erhöhung des Nitritgehaltes/Zellanzahl nach 24 h (157%), nach 48 h (453%) und nach 72 h (368%) ermittelt.

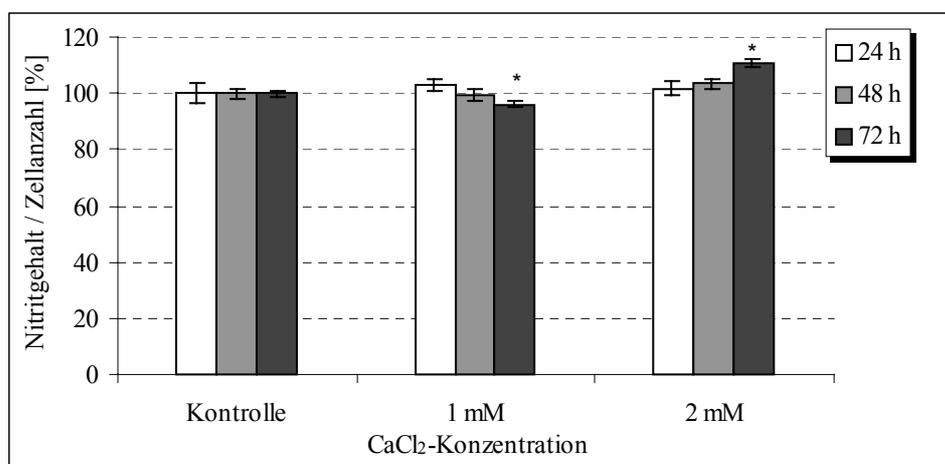


**Abb. 25:** Einfluß von L-Arginin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin);  $n = 3$ .

#### 4.2.2.2 Einfluß von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

Mit der Inkubation der HDMEC mit  $\text{CaCl}_2$  sollten dem EGM-MV freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zugeführt werden, um die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erhöhen und damit eine Änderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels zu erreichen, was zu einer Aktivitätssteigerung der NO-Synthase (eNOS) führen könnte.

In der Abbildung 26 sind die Ergebnisse zu diesem Versuch dargestellt. Nur bei 2 mM nach 72 h konnte ein geringer Anstieg des Nitritgehaltes/Zellanzahl (110%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt werden. Nach einer 24- und 48stündigen Inkubation mit der gleichen Konzentration an  $\text{CaCl}_2$  und über den gesamten Zeitraum der Behandlung mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  konnte keine Änderung des Nitritgehaltes mit der Griess-Reaktion nachgewiesen werden.

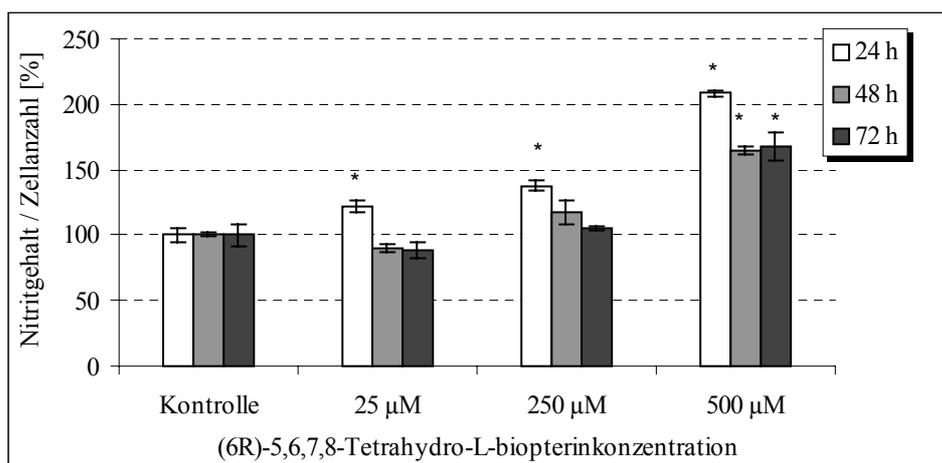


**Abb. 26:** Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $\text{CaCl}_2$ ) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.2.3 Einfluß von Tetrahydrobiopterin

Die Abbildung 27 zeigt den Einfluß von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) auf die Nitrit-Akkumulation in HDMEC.

Nach einer 24stündigen Inkubation mit BH<sub>4</sub> konnte eine dosisabhängige Erhöhung der NO-Freisetzung beobachtet werden. Dabei wurden bei 25 µM 122% ± 4,5, bei 250 µM 137% ± 3,8 und bei 500 µM 208 ± 1,7 des Nitritgehaltes im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Dagegen bewirkte nach 48 h und 72 h nur die höchste Konzentration an Tetrahydrobiopterin (500 µM) eine Steigerung.

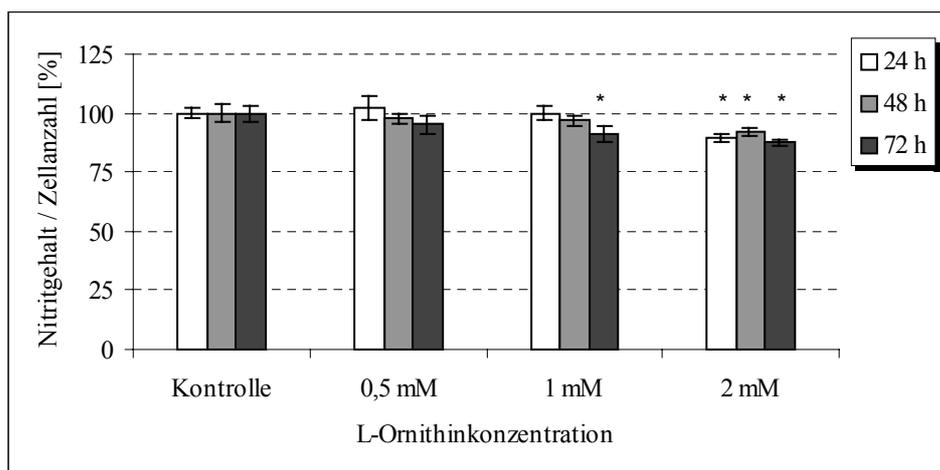


**Abb. 27:** Einfluß von (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-pterin (BH<sub>4</sub>) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; n = 3.

#### 4.2.2.4 Einfluß von L-Ornithin

L-Ornithin, ein L-Argininanalogon, wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,5–2 mM eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob durch eine L-Ornithin-verursachte Inhibierung des L-Arginineinstromes über das  $y^+$ -Transportsystem in die Zelle auch ein Effekt auf die NO-generierende Enzymreaktion festzustellen ist. Zuerst wurden verschiedene Konzentrationen an L-Ornithin bezüglich ihres Einflusses auf die Nitritakkumulation in HDMEC getestet, was die Abbildung 28 darstellt.

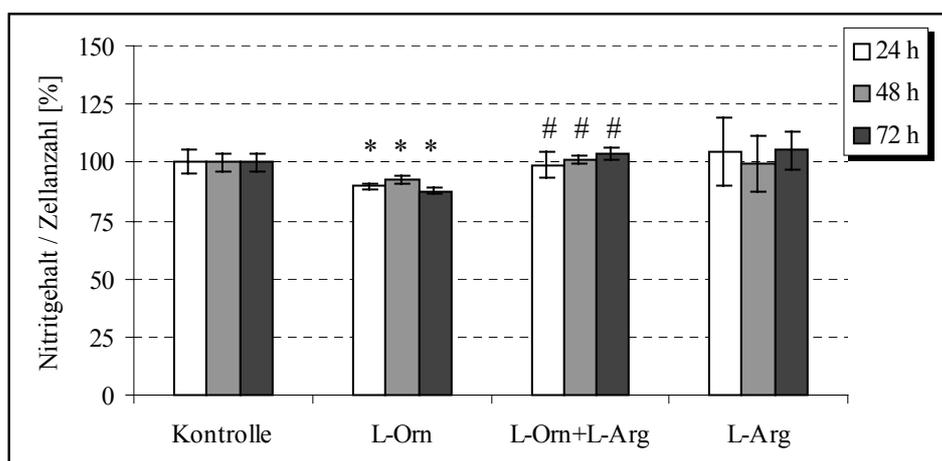
Nach der Inkubation mit 0,5 mM konnte keine Änderung der NO-Freisetzung über den gesamten Zeitraum festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich mit 1 mM L-Ornithin nach 24 h und 48 h. Nach 72 h trat eine Verringerung (91%) des Nitritgehaltes/Zellanzahl im Vergleich zur Kontrolle auf. Wurden 2 mM L-Ornithin dem Medium zugesetzt, konnte durch die Griess-Reaktion eine signifikante Senkung des Nitritgehaltes nachgewiesen werden. Nach 24 h wurden 89%, nach 48 h 92% und nach 72 h 87% Nitrit, jeweils verglichen mit der Kontrolle, detektiert. Der inhibitorische Effekt durch 2 mM war unabhängig von der Inkubationsdauer. Längere Behandlungszeiten als 24 h führten zu keiner weiteren Senkung der NO-Freisetzung.



**Abb. 28:** Einfluß von L-Ornithin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV, Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob der inhibitorische Effekt von 2 mM L-Ornithin bezüglich der NO-Freisetzung durch den gleichzeitigen Zusatz von 5 mM L-Arginin reversibel ist. Die Abbildung 29 stellt die Ergebnisse zu diesem Versuch dar.

Die durch 2 mM L-Ornithin hervorgerufene signifikante Abnahme des Nitritgehaltes (89%) konnte durch L-Arginin egalisiert werden, so daß der Kontrollwert der unbehandelten Probe erreicht wurde. Dieser Effekt trat nach 24 h, 48 h und nach 72 h in der Endothelzellkultur auf. Durch die alleinige Zugabe von 5 mM L-Arginin erhöhte sich im Medium nicht der Gehalt an Nitrit.

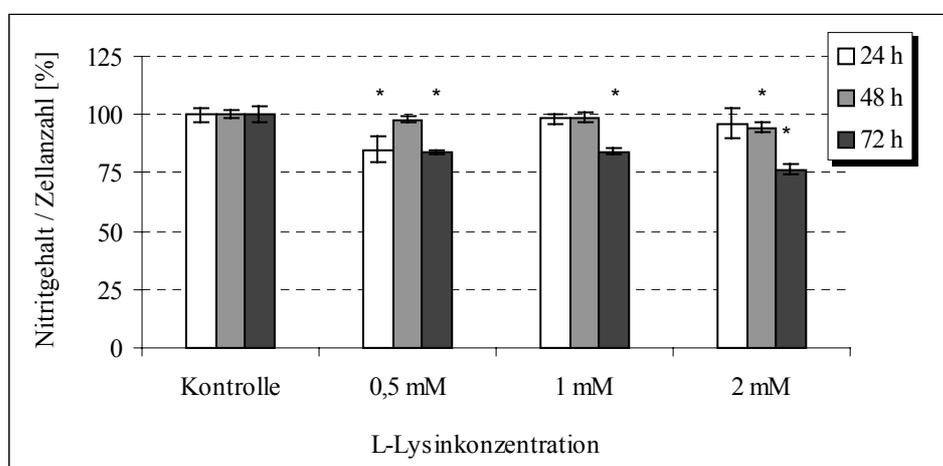


**Abb. 29:** Einfluß der gleichzeitigen Behandlung mit L-Ornithin (2 mM) und L-Arginin (5 mM) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich zur L-Ornithin-behandelten Probe (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin im Medium);  $n = 3$ .

#### 4.2.2.5 Einfluß von L-Lysin

Parallel zu den L-Ornithinversuchen wurde L-Lysin als eine weitere, durch das  $\gamma^+$ -System aufgenommene kationische Aminosäure in der Kultur humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen eingesetzt. Es wurden die gleichen Konzentrationen wie bei L-Ornithin verwendet.

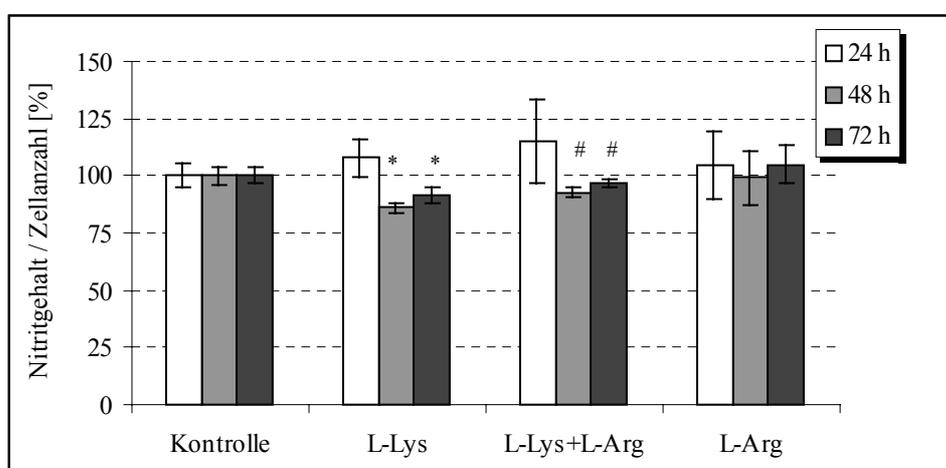
Die Abbildung 30 zeigt, daß nach 24 h nur 0,5 mM eine Verringerung (84%) der Nitritkonzentration/Zellanzahl im Medium bewirkte. Nach einer Inkubationszeit von 48 h war keine Verminderung zu beobachten. Nach 72 h hatten sowohl 0,5 mM, 1 mM als auch 2 mM einen hemmenden Einfluß auf die NO-Freisetzung. Es konnten hierbei 83%, 84% bzw. 76% der Nitritkonzentration im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.



**Abb. 30:** Einfluß von L-Lysin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

Ebenso wie im vorherigen Experiment mit L-Ornithin wurden HDMEC mit 2 mM L-Lysin und/oder 5 mM L-Arginin gleichzeitig inkubiert.

Die Abbildung 31 zeigt, daß eine alleinige Zugabe von 2 mM L-Lysin, wie bereits in Abbildung 30 dargestellt, nach 48 h und nach 72 h eine Senkung des Nitritgehaltes im Kulturmedium zur Folge hatte. Bei diesem Versuchsansatz war dieser Effekt deutlicher. Nach 24 h konnte auch hier kein Einfluß auf die NO-Freisetzung beobachtet werden. Die inhibierende Wirkung von 2 mM L-Lysin konnte nach 48 h und nach 72 h durch die simultane Applikation von 5 mM L-Arginin aufgehoben werden.



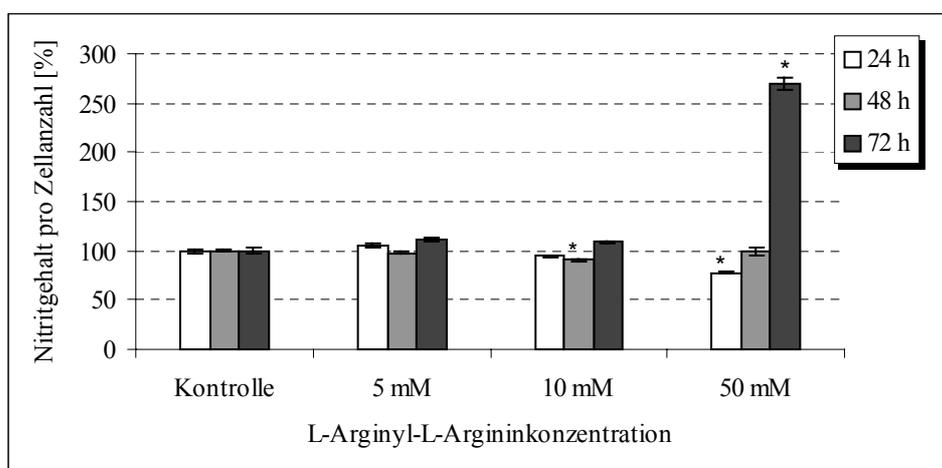
**Abb. 31:** Einfluß der gleichzeitigen Behandlung mit L-Lysin (2 mM) und L-Arginin (5 mM) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich zur L-Lysin-behandelten Probe (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin im Medium);  $n = 3$ .

#### 4.2.2.6 Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Arginin

Im Kapitel 4.2.1.6 wurden bereits die Ergebnisse zum Einfluß von L-Arg-Arg auf die Vitalität der HDMEC dargestellt. In Abbildung 32 sind die Daten zum Nitritgehalt/Zellanzahl nach verschiedenen Inkubationszeiten mit dem Dipeptid zusammengefasst.

Nach Zugabe von 5 mM L-Arg-Arg konnte nach 24 h und 48 h keine Änderung festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich mit 10 mM /24 h und 50 mM /48 h. Eine

leichte Verringerung des Nitritgehaltes wurde nach 48stündiger Inkubation mit 10 mM (90%) und nach 24stündiger Inkubation mit 50 mM (77%) L-Arg-Arg mit der Griess-Reaktion detektiert. Nach einer Substanzapplikation über 72 h deutete sich bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Erhöhung der NO-Freisetzung an, die bei 50 mM mit einer deutlichen Erhöhung des Nitritgehaltes auf 270% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar war.



**Abb. 32:** Einfluß von L-Arginyl-L-Arginin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

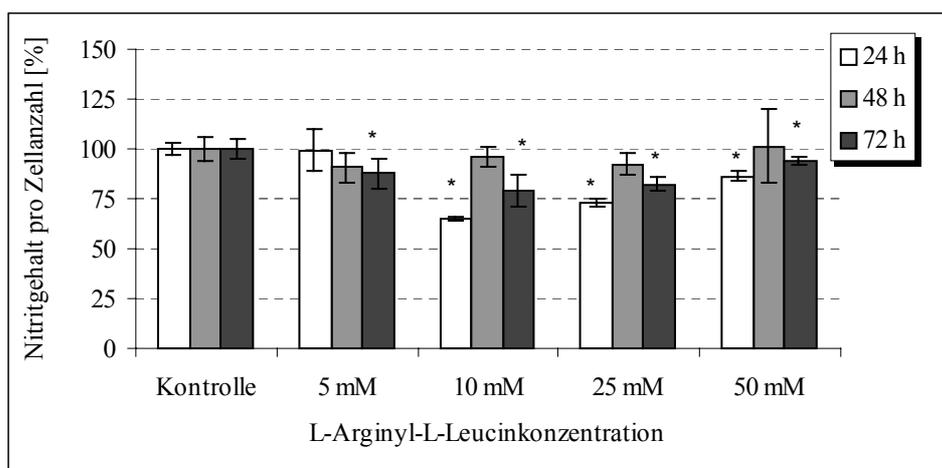
#### 4.2.2.7 Einfluß des Dipeptides L-Arginyl-L-Leucin

Als weiteres Dipeptid wurde L-Arginyl-L-Leucin (L-Arg-Leu) getestet und sein Einfluß auf die NO-Generierung in HDMEC untersucht.

Wie der Abbildung 33 zu entnehmen, zeigte eine 48stündige Inkubation mit allen Konzentrationen keinen signifikanten Effekt. Ebenso verhielt es sich mit 5 mM/ 24 h. Dagegen wurden bei 10 mM/ 24 h (65%), 25 mM/ 24 h (73%) und 50 mM/ 24 h (86%) erniedrigte Nitritwerte/Zellanzahl im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Weniger deutlich war der Effekt nach 72 h. So wurden bei 5 mM 87%, bei

10 mM 79%, bei 25 mM 82% und bei 50 mM 94% der Nitritwerte verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ermittelt.

Zu einer Erhöhung der NO-Freisetzung kam es bei keiner der eingesetzten Konzentrationen.



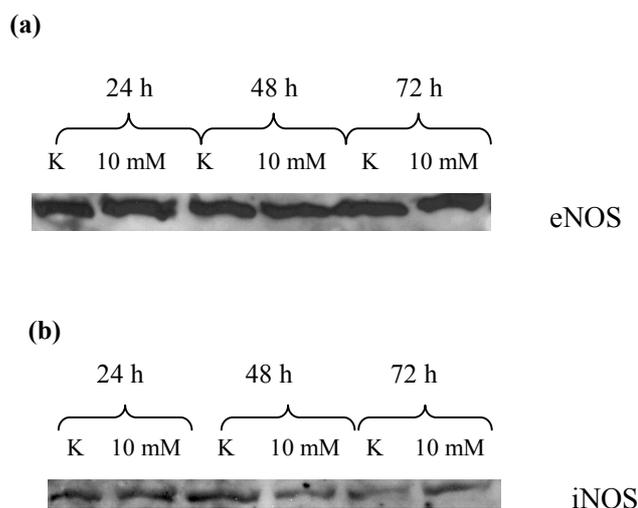
**Abb. 33:** Einfluß von L-Arginyl-L-Leucin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ .

#### 4.2.3 Einfluß von L-Arginin auf die Proteinexpression der NOS

Der negative Befund des L-Arginineinflusses bezüglich der NO-Freisetzung sollte durch Untersuchungen zum Expressionsprofil der NOS in humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen komplettiert werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf den Nachweis der konstitutiv exprimierten endothelialen (eNOS) sowie der induzierbaren NOS (iNOS).

Die Abbildungen 34a und 34b zeigen, daß HDMEC die Proteine für beide Isotypen der NOS exprimieren, wobei die eNOS wesentlich stärker exprimiert wurde als die iNOS.

Eine Zunahme der Proteinexpression durch 10 mM L-Arginin konnte nicht nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen bewirkten ebenfalls keine Expressionssteigerung.



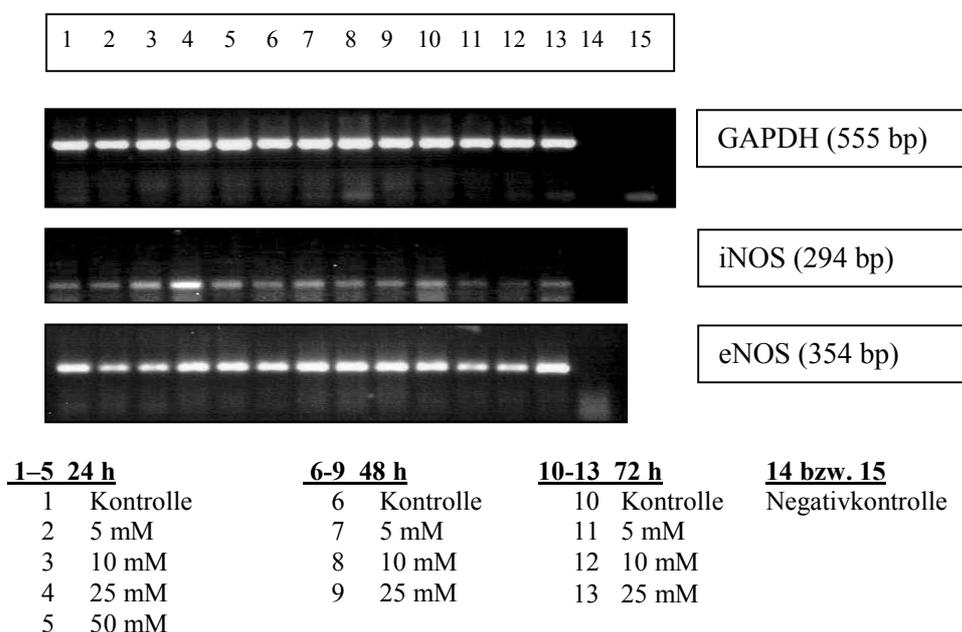
**Abb. 34:** Proteinexpression der (a) eNOS und (b) iNOS in HDMEC, 10 mM L-Arginin, nach 24, 48 und 72 h Inkubationsdauer in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Westernblot, Kontrolle (K) mit 0,5 mM L-Arginin Basalkonzentration im Medium; je 20 µg Protein, Molekulargewichte: eNOS (140 kDa), iNOS (130 kDa)

#### 4.2.4 Einfluß von L-Arginin auf die mRNA-Expression der NOS

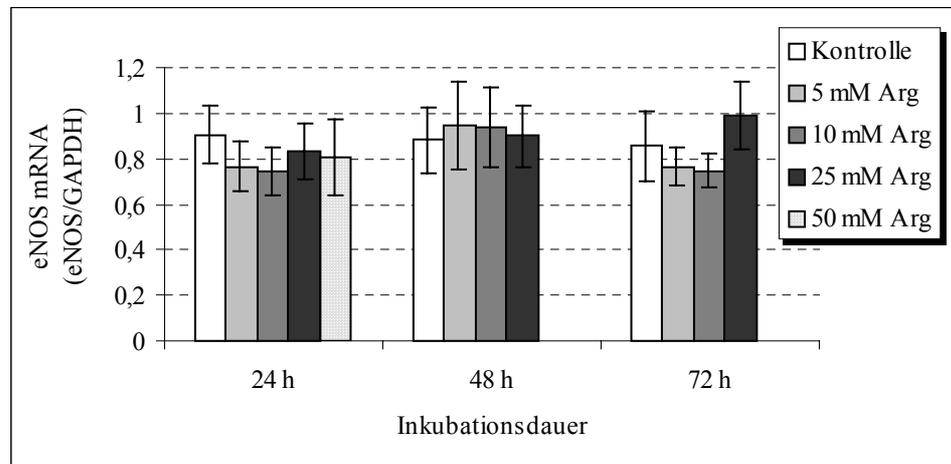
Parallel zu den Westernblotanalysen sollte mit Hilfe der RT-PCR die mRNA-Expression der endothelialen und der induzierbaren NO-Synthasen (eNOS, iNOS) in HDMEC untersucht werden. Ziel war zu klären, ob auf Transkriptionsebene das Substrat L-Arginin eine Änderung (Steigerung ?) der Expression der eNOS- und iNOS-Gene bewirkt. Hierfür wurden in der PCR genspezifische Primer eingesetzt, die eine Vervielfältigung der eNOS- bzw. iNOS-cDNA ermöglichten.

In Abbildung 35 ist eine repräsentative RT-PCR für eNOS, iNOS und GAPDH dargestellt. Die Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igen

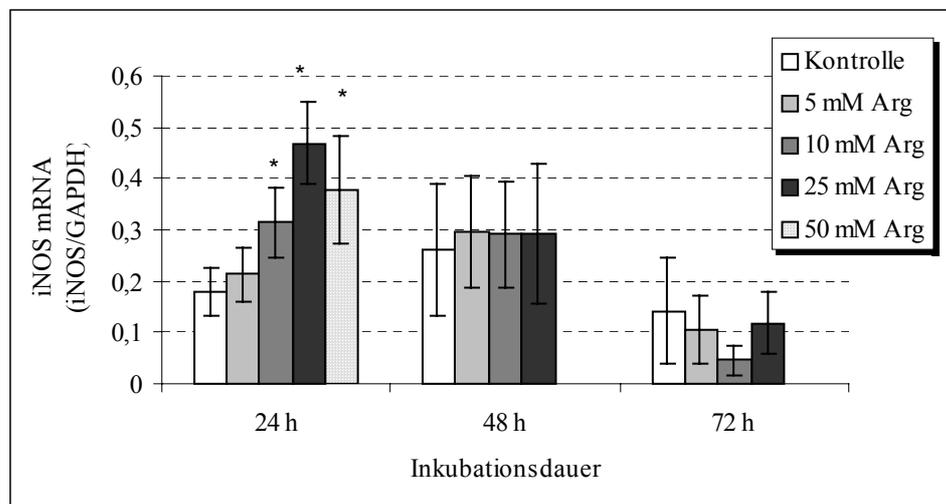
Agarosegel aufgetrennt und die Bandenintensität der einzelnen Fragmente densitometrisch ausgewertet und jeweils das Verhältnis zu den GAPDH-Amplifikaten errechnet. Die semiquantitative Auswertung ist in den Abbildungen 36 und 37 zusammengefasst. Es konnten die Transkripte der eNOS- und iNOS-mRNA nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen L-Argininkonzentration und mRNA-Expression konnte für die endotheliale NOS nicht festgestellt werden (Abb. 36). Auch längere Inkubationszeiten führten zu keiner Änderung. Dagegen konnte eine Zunahme der Bandenintensität der iNOS-PCR-Produkte nachgewiesen werden (Abb. 37). Nach 24 h war in den unbehandelten Zellen (Kontrolle mit 0,5 mM L-Arginin) eine geringe Expression der iNOS-mRNA zu verzeichnen. Mit steigender L-Argininkonzentration kam es zu einer Erhöhung der Expression. Ein anderes Bild ergab sich nach einer Inkubationsdauer von 48 h und auch nach 72 h. Hierbei waren keine konzentrationsabhängigen Veränderungen der iNOS-mRNA-Expression festzustellen.



**Abb. 35:** Einfluß von L-Arginin auf die mRNA-Expression der eNOS und iNOS in HDMEC, nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: RT-PCR mit spezifischen Primern; Negativkontrolle: anstelle der cDNA als Template wurde DEPC-H<sub>2</sub>O in der PCR eingesetzt; n = 3.



**Abb. 36:** Semiquantitative Auswertung der RT-PCR-Produkte für eNOS, bezogen auf die RT-PCR-Produkte von GAPDH; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM L-Arginin Basalkonzentration im Medium);  $n = 3$ .



**Abb. 37:** Semiquantitative Auswertung der RT-PCR-Produkte für iNOS, bezogen auf die RT-PCR-Produkte von GAPDH; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM L-Arginin Basalkonzentration im Medium);  $n = 3$ .

Anhand einer weiteren Negativkontrolle konnte sichergestellt werden, daß die RNA, die anschließend für die cDNA-Synthese genutzt wurde, keine DNA-Kontamination

enthielt. Hierzu wurde in verschiedenen PCR-Ansätzen jeder Probe die cDNA durch RNA eingesetzt. Dabei waren bei keiner der Proben PCR-Produkte mit den entsprechenden Fragmentgrößen (555 bp, 294 bp, 354 bp) nachzuweisen. Somit wurde gewährleistet, daß die in der RT-PCR ermittelten Fragmente tatsächlich anhand der cDNA bzw. der mRNA amplifiziert wurden (nicht abgebildet).

#### **4.2.5 Sequenzanalyse der amplifizierten PCR-Produkte**

Um zu gewährleisten, daß es sich bei den amplifizierten Fragmenten tatsächlich um die Transkripte von eNOS, iNOS und GAPDH handelte, wurden diese auf einem ABI-Sequencer 733 (Applied Biosystems) im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Universität in Halle sequenziert und die erhaltene Basensequenz mit der NCBI-Datenbank verglichen. Bei allen drei analysierten Proben ergab die Auswertung der jeweiligen Sequenzen eine alleinige Zuordnung mit hohen Homologien zu den publizierten eNOS-, iNOS- und GAPDH-Sequenzdaten.

## 5 Diskussion

### 5.1 L-Arginin

Stickstoffmonoxid (NO), in der Literatur auch als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet (Girerd et al., 1990; Mugge et al., 1991), ist eines der Abbauprodukte des L-Argininmetabolismus, in dem die NO generierenden Enzyme, die NO-Synthasen (NOS) involviert sind. Es liegen eine Vielzahl von Studien vor, in denen die Rolle von NO und der NO-Synthasen bei der Regulation zahlreicher Abläufe in der Haut untersucht wurde (Bruch-Gerharz et al., 1996; Bull et al., 1996; Goldsmith et al., 1996; Sersjo et al., 1996; Shimizu et al., 1997; Clough et al., 1998; Wenzel et al., 1999; Joshi et al., 1999; Katugampola et al., 2000; Kane et al., 2001; Kagoura et al., 2001; Minson et al., 2001; Rocha and Guillo, 2001; Wallengren and Larsson, 2001 etc.).

In der vorliegenden Arbeit wurden physiologisch relevante Verbindungen in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen getestet und deren modulierender Einfluß bezüglich der L-Arginin-vermittelten NO-Generierung untersucht.

Zunächst wurde die nichtessentielle, kationische Aminosäure L-Arginin eingesetzt. In der Zellkultur von HDMEC wurden L-Argininkonzentrationen bis 50 mM über eine Zeitdauer von 24, 48 und 72 h in phenolrotfreiem EGM-MV (ohne Hydrocortison und Rinderhirnextrakt) appliziert. Das verwendete Medium enthielt eine L-Arginin-Basalkonzentration von 0,5 mM. Die NO-Freisetzung wurde über die Akkumulation von Nitrit im Kulturüberstand mit der Griess-Reaktion (Green et al., 1982) bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bis 50 mM L-Arginin keine Änderung der NO-Freisetzung auftrat. Die Autoren Arnal et al. (1995) testeten ebenfalls den Einfluß von extrazellulär zugeführtem L-Arginin auf die NO-Freisetzung in Rinderaorta-Endothelzellen. Sie konnten durch steigende Konzentrationen (0,01-10 mM) keine Erhöhung nachweisen. Dieser Befund geht mit unseren Ergebnissen zu dem L-Argininversuch konform. Die Autoren um Girerd et al. (1990), Creager et al. (1992) und Drexler et al. (1991) konnten dagegen bezüglich der coronalen Mikrozirkulation *in vivo* an hypercholesterolemischen Patienten sehr deutlich eine Erhöhung der NO-Freisetzung sowie eine damit auftretende Vasodilation nach L-Argininapplikation aufzeigen. Nur einen sehr schwachen positiven Befund hinsichtlich einer Endothelium-abhängigen

Vasodilatation durch L-Argininzugabe konnten andere Arbeitsgruppen *in vitro* nachweisen (Cooke et al., 1991(a); Mugge et al., 1991). In einem *in vivo* System konnten Wohlrab und Marsch (1999) eine vasoaktive Wirkung von L-Arginin feststellen. Am CAM-Hühnerei-Modell wurde mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie die NO-vermittelte Vasodilatation im Ausmaß und im zeitlichen Ablauf charakterisiert. Es konnte dabei ein deutlicher konzentrationsabhängiger vasodilatativer Effekt beobachtet werden. Eine mögliche Modulation der NO-Produktion *in vivo* durch Argininsupplementation stellte auch Harrison (1997) in einer Übersichtsarbeit dar.

Der Zusammenhang zwischen Substratabhängigkeit und extra- bzw. intrazellulärer L-Argininkonzentration ist nicht einfach zu erfassen. Es ist bekannt, daß in Endothelzellen die NO-Generierung über die endotheliale NOS von einer ausreichenden und kontinuierlichen L-Argininzufuhr abhängig ist (Aisaka et al., 1989; Cooke et al., 1991b; Rossitch et al., 1991; Creager et al., 1992; Taylor and Poston, 1994; Devés and Boyd, 1998). Mehrere Arbeitsgruppen konnten anhand von Untersuchungen an Endothelzellen einen Km-Wert für L-Arginin als Substrat für die NOS von 2-10  $\mu\text{M}$  ermitteln (Arnal et al., 1995; Bogle et al., 1996; McDonald et al., 1997; Kurz and Harrison, 1997; Closs et al., 2000). Die intrazelluläre L-Argininkonzentration dagegen liegt in einem Bereich, der 30-800fach über dem Km-Wert liegt. In Endothelzellen wurden Konzentrationen von 0,1-0,8 mM L-Arginin nachgewiesen (McDonald et al., 1997). Somit scheint eine Steigerung der NO-Produktion durch extrazelluläres L-Arginin gar nicht möglich. Allerdings zeigten mehrere *in vivo* Studien, daß unter bestimmten physiologischen Bedingungen tatsächlich eine Zunahme der NO-Freisetzung trotz des gesättigten intrazellulären Zustandes möglich ist. Dieses Phänomen wird als „arginine paradox“ bezeichnet (McDonald et al., 1997; Closs et al., 2000; Xiao et al., 2001). Außerdem wird diskutiert, daß eine mögliche Kompartimentierung des L-Arginins in der Zelle eine Variation der intrazellulären Konzentration nicht oder nur durch enorm hohe L-Arginindosen erlaubt (Arnal et al., 1995).

Eine Modulation der NO-Produktion durch Änderung der extrazellulären L-Argininkonzentration könnte somit vor allem *in vivo* unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. Bluthochdruck oder bei Hypercholesterolemie möglich sein, bei denen kennzeichnend der intrazelluläre L-Argininspiegel stark gesenkt oder die Aktivität der NO-generierenden Enzyme verringert sind.

Wir konnten zeigen, daß 50 mM L-Arginin neben der hohen NO-Freisetzung eine starke Reduktion der Zellanzahl zur Folge hatte. Somit muß bei einer Konzentration von 50 mM von einem toxischen Effekt der Aminosäure ausgegangen werden, was sich in einer Zellschädigung äußerte. Ob die beobachtete zellschädigende Wirkung von 50 mM L-Arginin tatsächlich ausschließlich auf eine erhöhte NO-Produktion zurückzuführen ist, ist fraglich. Allerdings ist bekannt, daß hohe NO-Konzentrationen zytotoxisch sind (Busconi and Michel, 1993; Rubbo et al., 1994; Ioannidis et al., 1998; Suschek et al., 1999). Der zellschädigende Effekt von NO beruht auf sein Reaktionspotential als freies Radikal ( $\bullet\text{NO}$ ). Die biologische Halbwertszeit wird mit  $t_{1/2} = 5\text{-}50$  sec angegeben (Knowles and Moncadas, 1993; Rubbo et al., 1994; Clough, 1999). Es kann mit Eisen-Schwefel-enthaltenen mitochondrialen Enzymen reagieren (Hibbs et al., 1988) und die DNA- und Proteinsynthese hemmen (Nathan, 1992). Außerdem kann eine Inhibierung von Cytochrom P-450 (Wink et al., 1993), der Aconitase (Hibbs et al., 1988) und der Lipoxygenase (Kanner et al., 1992) auftreten. Bedeutend für die zytotoxische Wirkung ist ebenfalls die schnelle Reaktion von  $\bullet\text{NO}$  mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie dem Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) zum Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) und Peroxynitrosäure ( $\text{ONOOH}$ ) (Villiotou and Deliconstantinos, 1995; Jude et al., 1999; Lee et al., 2000), auch als „reaktive nitrogen oxide species“ (RNOS) bezeichnet. Eine Folge dessen ist RNOS-vermittelter Streß (Weller, 1999). So induziert Peroxynitrit eine Lipid- und Proteinperoxydation (Radi et al., 1991a; Radi et al., 1991b; Bruch-Gerharz et al., 1998; Lee et al., 2000a). Auch Kohlenhydrate (Beckman et al., 1990), DNA (King et al., 1992) und subzelluläre Organellen (Radi et al., 1994) können durch Peroxynitrit oxidativ geschädigt werden.

Dem gegenüber steht die physiologische Bedeutung von NO, freigesetzt in geringen Mengen. Dabei agiert NO vor allem als inter- und intrazelluläres Signalmolekül beispielsweise bei der hämodynamischen Regulation, der Wundheilung und der Neurotransmission (Ketteler et al., 1994; Frank et al., 2000; Kaposzta et al., 2001).

## 5.2 Ca<sup>2+</sup> Ionen

Die konstitutiv exprimierte NO-Synthase, zu der eNOS und nNOS zählen, ist unter anderem durch ihre Abhängigkeit von der Verfügbarkeit des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>/Calmodulinkomplexes gekennzeichnet (Bogle et al., 1996; Bruch-Gerharz et al., 1998; Govers and Rabelink, 2001). Eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration hat eine vermehrte Ausbildung dieses Komplexes zur Folge und somit eine Aktivierung der NO-Synthase (Deliconstantinos et al., 1995). In der Literatur wurde bereits die Hormon-vermittelte Regulation der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beschrieben, wie zum Beispiel durch Bradykinin (Gosink and Forsberg, 1993), Estradiol (Goetz et al., 1999), Serotonin (Bruning et al., 1993), VEGF (Papapetropoulos et al., 1997) und Histamin (Kelm et al., 1993). Daten über eine mögliche Erhöhung der internen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch exogene Zufuhr in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen sind nicht bekannt.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch Zugabe von 2 mM CaCl<sub>2</sub> zur HDMEC-Kultur nach 48 h Inkubation eine 10%ige Zunahme des Nitritgehaltes im Kulturmedium nachgewiesen werden, was auf eine gesteigerte Aktivität des NO-generierenden Enzyms (eNOS) schließen lässt. Die Autoren Shaul et al (1994) beschrieben ebenfalls eine Aktivitätssteigerung der NOS in H411-humanen bronchialen epidermalen Zellen, allerdings durch Zugabe von nur 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Zudem war eine Erhöhung der Guanylylcyclase-Aktivität zu beobachten. Das von diesem Enzym generierte cGMP ist wiederum ein wichtiger Modulator der intrazellulären Calcium-Homöostase (XU et al., 1994a). Wurde simultan mit EDTA, einem Ca<sup>2+</sup>-Chelator, inkubiert, trat eine drastische Abnahme der Enzymaktivität ein. Ebenfalls eine verringerte NOS-Aktivität hatte in einem Enzymassay mit humanen Keratinozyten die Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zur Folge (Baudouin and Tachon, 1996). Ziel der Studie von Mugge et al. (1991) war durch eine Blockade der Calciumkanäle eine mögliche Inhibierung der NO-Freisetzung. Allerdings konnten sie trotz der Abhängigkeit der NO-Generierung von der Verfügbarkeit extrazellulären Calciums keine Hemmung feststellen. Eine Stimulation der NOS-Aktivität (und der cGMP-Produktion) konnten die Autoren Xu et al. (1997) durch Inkubation von Ratten-Pankreaszellen mit Ca<sup>2+</sup>-mobilisierenden Agonisten erreichen. In der Übersichtsarbeit von Harrison (1997) wird

außerdem eine Steigerung der NO-Freisetzung im Endothelium durch Calcium-Ionophoren, wie z.B. durch die Verbindung A23187 diskutiert. Ferner wurde in der 1993 publizierte Arbeit von Woll et al. gezeigt, daß Pteridin-Derivate, unter anderem 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), in humanen Monozyten die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration signifikant erhöhen. Folglich ist unter Berücksichtigung unserer Daten und der aufgeführten Publikationen davon auszugehen, daß eine Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration prinzipiell möglich ist, aber eine Zunahme des Ca<sup>2+</sup>-Influx in die Zellen durch alleinige Zugabe von CaCl<sub>2</sub> nicht oder nur sehr schwach zu erreichen ist und somit keine effektive NOS-Aktivitätssteigerung möglich erscheint.

### 5.3 Tetrahydrobiopterin

Eine gemeinsame Eigenschaft der drei bekannten NOS-Isoformen (eNOS, iNOS, nNOS) ist die Abhängigkeit der NO-Generierung von der Verfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (Dudsek et al., 2001). BH<sub>4</sub> stellt einen essentiellen aktiven Cofaktor der NOS dar (Milstien and Katusic, 1999; Heitzer et al., 2000; Shinozaki et al., 2000). Außerdem bildet BH<sub>4</sub> eine wichtige Komponente aromatischer Aminosäure-Hydrolasen, wie z.B. der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Hydrolase (Dudsek et al., 2001; Laursen et al., 2001; Sumi-Ichinose et al., 2001; Yoshida et al., 2001). Bezüglich der Funktionsfähigkeit der NO-Generierung durch die NO-Synthase ist eine optimale intrazelluläre Konzentration von Tetrahydrobiopterin entscheidend (Heller et al., 2001; Katusic, 2001). Die Bedeutung von BH<sub>4</sub> in der Rolle als Cofaktor der NOS kann neben der bekannten NO-Katalyse (Transfer von Elektronen) folgendermaßen beschrieben werden:

- 1.) BH<sub>4</sub> stabilisiert durch seine Bindung an die NO-Synthase den aktiven Dimerenzymkomplex,
- 2.) es erhöht als allosterischer Effektor die Substratbindungsfähigkeit (L-Arginin),
- 3.) es übt einen Einfluß auf die Calcium-abhängige NO-Produktion (Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration) aus (Woll et al., 1993; Shinozaki et al., 2000; Walter et al., 2000; Heller et al., 2001; Katusic, 2001).

Eine Verminderung des intrazellulären BH<sub>4</sub>-Spiegels, verursacht durch eine gestörte BH<sub>4</sub>-Synthese, resultiert in einer verminderten Freisetzung des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxids (NO) und aufgrund der fehlgesteuerten Enzymfunktion der NO-Synthase zu einer gesteigerten Generierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, wie Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (Milstien and Katusic, 1999; Heitzer et al., 2000; Tiefenbacher et al., 2000; Laursen et al., 2001; Marinos et al., 2001; Tiefenbacher, 2001; Vasquez-Vivar et al., 2001). Pathophysiologische Symptome einer solchen gestörten Endothelzellfunktion treten bei Hypercholesterolämie, Hyperglykämie, Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Atherosklerose auf (Heitzer et al., 2000; Jiang et al., 2000; Tiefenbacher et al., 2000; Walter et al., 2000; Gori et al., 2001; Katusic, 2001; Laursen et al., 2001; Tiefenbacher, 2001). Auch übermäßiger Zigaretten- und Alkoholkonsum verursachen eine Störung der Vasomotion aufgrund der verminderten NO-Generierung (Higman et al., 1996; Ueda et al., 2000; Sun et al., 2001). Es gibt bereits verschiedene Ansätze von Therapien, diese Dysfunktion der Endothelzellen zu beheben, die die Zufuhr von NO-Donoren, L-Arginin als Substrat, Antioxidantien etc. einschließen (Katusic, 2001). Aktuelle Arbeiten zeigen, daß unter anderem die Supplementation des Cofaktors Tetrahydrobiopterin selbst einen therapeutischen Effekt aufweist. So konnten Shinozaki et al. (2000) in Aortagefäßen von Insulin-resistenten Ratten zeigen, daß eine orale BH<sub>4</sub>-Applikation die Endothelium-abhängige gestörte Vasodilation wiederherstellt und den ROS-vermittelten Streß vermindert. Eine Erhöhung der gestörten NO-Freisetzung durch exogenes BH<sub>4</sub> *in vivo* wurde auch bei Patienten mit Typ II Diabetes mellitus (Heitzer et al., 2000); bei Rauchern (Ueda et al., 2000); bei atherosklerotischen Patienten (Walter et al., 2000); bei Hypercholesterolämie (Laursen et al., 2001); bei Patienten mit einer mikrovaskulären Herz-Kranzstörung (Setoguchi et al., 2001) beschrieben sowie in tierexperimentellen Untersuchungen von den Autoren um Sun et al. (2001) in cerebralen Arteriolen von Alkohol-gefütterten Ratten; Yu et al. (2001) in mikrovaskulären Endothelzellen von diabetischen Rattenaugen. Ferner wurde durch Behandlung mit Sepiapterin, einer Vorstufe des Tetrahydrobiopterins, die Endothelium-abhängige Dysfunktion behoben. Diesen Effekt konnten Meininger et al. (2000) in Endothelzellen von diabetischen Ratten und Tiefenbacher et al. (2000) in Herzkranzgefäßen von Atherosklerose-Patienten zeigen. Eine gekoppelte Therapie mit L-Arginin/BH<sub>4</sub> war bei der Behandlung von

atherosklerotischen Maus-Aortagefäßen bereits erfolgreich (Jiang et al., 2000). Interessant war die *in vitro*-Studie von Schwartz et al. (2001), in der Ratten-Herzmyozyten ebenfalls mit BH<sub>4</sub> (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM) inkubiert wurden und konzentrationsabhängig die mRNA-Expression von CAT-2 (cationic amino acid transport protein des y<sup>+</sup>Transporters) erhöht war und somit der L-Arginintransport moduliert werden könnte. Ein weiterer Ansatzpunkt einer möglichen Therapie zur Behebung der verminderten NO-Freisetzung könnte die Gabe von Vitaminen sein. Heller et al. (2001) demonstrierten in ihrer Arbeit, daß L-Ascorbinsäure in physiologisch relevanten Konzentrationen (100 µM) den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel in Nabelschnurendothelzellen erhöhten, allerdings nicht aufgrund einer Stimulation der BH<sub>4</sub>-Synthese, sondern vielmehr durch eine chemische Stabilisierung des Moleküls. Eine Erhöhung der Verfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin durch Folsäureapplikation und damit verbunden eine Steigerung der NO-Produktion zeigten Gori et al. (2001). In einer *in vivo* Studie wurde durch eine Nitroglycerinbehandlung an gesunden Probanden eine gestörte NOS-Funktion, verursacht durch eine verminderte BH<sub>4</sub>-Bioverfügbarkeit, simuliert und infolgedessen erhöhter oxidativer Streß hervorgerufen. Eine anschließende Folsäuretherapie bewirkte eine Regeneration der reduzierten BH<sub>4</sub>-Form, und somit konnte die funktionale Interaktion zwischen Tetrahydrobiopterin und der NO-Synthase wiederhergestellt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß exogen zugeführtes Tetrahydrobiopterin eine Stimulation der NO-Freisetzung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen verursachte. Die Zellen wurden hierbei über 72 h mit 25 µM, 250 µM und 500 µM BH<sub>4</sub> inkubiert. Nach der 24stündigen Applikation wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme des Nitritgehaltes im Kulturmedium nachgewiesen, während nach 48 h nur bei 250 µM und 500 µM und nach 72 h nur noch bei 500 µM die NO-Generierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht war. Das lässt die Schlussfolgerung zu, daß HDMEC in der Lage waren, zum einen den exogen zugeführten Cofaktor der NOS in die Zelle zu transportieren und zum anderen dadurch die NOS-Aktivität zu steigern. Dieser konzentrationsabhängige Effekt der Stimulation ließ mit zunehmender Inkubationsdauer nach. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß die von uns kultivierten HDMEC selbst einen geringen

intrazellulären BH<sub>4</sub>-Spiegel aufweisen, so daß eine extrazelluläre Zufuhr eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration und folglich eine zunehmende NO-Produktion bewirkte. Nach 48 h und nach 72 h war anscheinend durch den erhöhten BH<sub>4</sub>-Verbrauch dessen Gehalt in der Zelle so gering, daß, wie bereits ohne BH<sub>4</sub>-Applikation, nur eine geringe NO-Generierung möglich war. Katusic (2001) diskutierte in seiner Arbeit, daß bereits Studien an kultivierten Endothelzellen eine Stimulation der eNOS-Aktivität durch Erhöhung des BH<sub>4</sub>-Levels zeigten (Werner-Felmayer et al., 1993). Rosenkranz-Weiss et al. (1994) demonstrierten, daß der BH<sub>4</sub>-Gehalt in frisch isolierten Endothelzellen (Nabelschnur-EZ) signifikant höher war als in kultivierten Endothelzellen. Diese Zellkultur-bedingte Abnahme erklären die Autoren damit, daß anscheinend eine Ungleichgewicht zwischen BH<sub>4</sub>-Efflux und intrazelluläre Speicherung im Laufe der Kultivierung entsteht (Gross et al., 2000). In unseren Zellversuchen wurde die 2. Passage eingesetzt, also keine frisch isolierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß eine Modulation der NO-Synthase-Aktivität in HDMEC *in vitro* durch exogenes BH<sub>4</sub> erreicht wurde. Hinsichtlich des toxischen Potentials des durch die stimulierte Enzymaktivität vermehrt freigesetzte Stickstoffmonoxid muß natürlich berücksichtigt werden, daß eine Zunahme der NO-Produktion eine Verringerung teilungsfähiger Zellen, in unseren Versuchen auf 60%, bewirkte.

Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Daten einer positiven Modulation der NOS-Aktivität über Tetrahydrobiopterin wird auch eine Hemmung der Verfügbarkeit dieses Cofaktors als mögliche Therapie diskutiert. Bei Patienten mit der Pigmentstörung Vitiligo wurde eine Überproduktion von Tetrahydrobiopterin in Melanozyten und somit eine vermehrte NO-Freisetzung nachgewiesen. Als mögliche Therapeutika könnten NOS-Inhibitoren, NO-Fänger oder auch Inhibitoren der BH<sub>4</sub>-Synthese eingesetzt werden (Schallreuter et al., 1994; Rocha and Guillo, 2001). So hemmen Glycocorticoide die GTP-Cyclohydrolase, eines der BH<sub>4</sub>-Synthaseenzyme (Johns et al., 2001). Bune and Cook (1996) konnten durch die Verbindung 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (DAHP) die *de novo* Synthese von BH<sub>4</sub> hemmen.

Marinos et al. (2001) diskutieren neben der gesteigerten NO-Produktion einen anderen Aspekt der Wirkung von Tetrahydrobiopterin. Die Autoren konnten zeigen, daß eine Zufuhr von BH<sub>4</sub>, Sepiapterin und/oder NO-Donoren die Proliferation von

mikrovaskulären Herz-Kranz-Ratten-Endothelzellen erhöhten und somit die gestörte Angiogenese bei Diabetes mellitus-Patienten beheben könnten.

#### 5.4 L-Ornithin und L-Lysin

Die von uns eingesetzten kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin werden in Säugetierzellen über das  $\gamma^+$ -System („cationic amino acid transport system“) in die Zelle transportiert (Rhodes et al., 1996; Deves and Boyd, 1998). Auch der Efflux dieser Aminosäuren aus die Zelle erfolgt primär über den membranständigen  $\gamma^+$ -Transporter (White et al., 1982; White and Christensen, 1982). Die Regulation des Transportes dieser Aminosäuren ist von entscheidender Bedeutung für diverse Biosynthesen, wie zum Beispiel die von Stickstoffmonoxid, Creatin, Carnitin und Polyaminen (Avila-Chavez, 1997; Selamnia et al., 1998).

In der Arbeit wurde in einer Kultur von HDMEC untersucht, ob die um das  $\gamma^+$ -System konkurrierenden kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin einen Einfluß auf die NO-Generierung ausüben, was auf einen inhibierenden Effekt bezüglich der intrazellulären L-Argininverfügbarkeit hinweisen würde. Dabei konnte gezeigt werden, daß 2 mM L-Ornithin nach den Inkubationszeiten 24 h, 48 h und 72 h eine geringe, aber doch signifikante Abnahme des Nitritgehaltes/ Zellanzahl in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen zur Folge hatten. Die Zugabe von 0,5 mM und 1 mM zeigte keine bzw. geringe Wirkung auf den Nitritgehalt. Wurden die Zellen gleichzeitig mit 2 mM L-Ornithin und 5 mM L-Arginin coinkubiert, wurde die durch L-Ornithin verursachte Inhibierung der NO-Freisetzung aufgehoben. Dieser Effekt trat nach allen Inkubationszeiten auf. Parallel zu diesen Versuchen mit L-Ornithin wurde L-Lysin in der Endothelzellkultur eingesetzt, wobei sich bezüglich der NO-Freisetzung eine ähnliche Tendenz ergab, das heißt: Verringerung des Nitritgehaltes durch L-Lysin (2 mM) und durch gleichzeitige Applikation beider Aminosäuren (L-Lys + L-Arg) wieder ein Ansteigen auf Kontrollniveau.

Die Autoren Bogle et al. (1992a) konnten in Versuchen mit einer Zelllinie von Mausmakrophagen ebenfalls einen inhibitorischen Einfluß von L-Lysin und L-Ornithin auf die NO-Synthese feststellen. Ein mit unseren Ergebnissen vergleichbares Resultat

erzielten auch Closs et al. (2000). Durch zellbiologische Untersuchungen an einer Makrophagenzelllinie zeigten die Autoren nach einer Inkubation mit 2 mM L-Lysin eine Reduktion der NO-Generierung und durch Supplementierung mit 2 mM L-Arginin eine normalisierte NO-Synthese. Ferner wurde in einer 1997 publizierten Veröffentlichung von Liaudet et al. die Aminosäure L-Lysin als ein potentieller natürlicher Inhibitor bezüglich einer NO-Überproduktion, wie bei einem endotoxischen Schock, diskutiert. Eine solche durch L-Lysin und L-Ornithin verursachte verringerte NO-Freisetzung ist auf einen hemmenden Effekt dieser Aminosäuren auf den L-Arginin-Transport in die Zelle zurückzuführen. Mehrere publizierte „uptake“-Studien belegen diesen Sachverhalt (Vasta et al., 1995; Bogle et al., 1992b; Bogle et al., 1996; Cendan et al., 1996; Wayte et al., 1996; Liaudet et al., 1997; Dolinska and Albrecht, 1998; Hammermann et al., 1999; Closs et al., 2000; Xiao et al., 2001). Die Autoren konnten neben einem verringerten L-Arginininflux eine damit einhergehende Abnahme der intrazellulären L-Argininkonzentration nachweisen. Somit steht der Zelle im Vergleich zu Normalbedingungen weniger intrazelluläres L-Arginin für diverse Stoffwechselfvorgänge, wie unter anderem für die NO-Synthese durch die NO-Synthasen, zur Verfügung.

Ein Isoenzym der NO-Synthase, die endotheliale NOS (eNOS) ist wie das  $\gamma^+$ -Transportsystem membrangebunden (Bogle et al., 1996). Es wird sogar eine mögliche Co-Lokalisation von eNOS und einem Protein des Transporters (CAT1) diskutiert, was eine optimale Substratversorgung des NO-generierenden Enzyms ermöglicht (McDonald et al., 1997, Xiao et al., 2001). Die Autoren schlussfolgerten dies aufgrund von immunohistochemischen Analysen an Schweine-Pulmonararterien-Endothelzellen (PAEC) mit spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine. Ebenfalls die Hypothese einer Co-Lokalisation vertreten Closs et al. (2000). Die Autoren vermuten, daß in aktivierten Makrophagen die induzierbare NO-Synthase (iNOS) durch eine Komplexbildende Einheit mit einem anderen Transporterprotein (CAT-2B) eine NO-Generierung gewährleistet wird. Durch solche Co-Lokalisationen kommt es zur Bildung von sogenannten zellulären Mikrodomänen, in denen andere L-Argininkonzentrationen vorzufinden sind als im übrigen Zytoplasma. Wird nun die extrazelluläre Konzentration an anderen kationischen Aminosäuren, wie L-Ornithin und L-Lysin erhöht, transportiert das  $\gamma^+$  System diese bevorzugt, was dazu führt, daß aufgrund der Lokalisation von CAT-

Proteinen und NOS die Versorgung mit dem NOS-Substrat L-Arginin eingeschränkt ist. Eine verminderte NO-Generierung ist dann die Folge. Eine vermehrte L-Argininsupplementierung kann den Zustand eines bevorzugten L-Arginintransportes wiederherstellen.

Publizierte Arbeiten anderer Autoren zeigen zu unseren Ergebnissen abweichende Daten. Escobales et al. (2000) konnten in Untersuchungen an vaskulären glatten Muskelzellen keinen Effekt von 5 mM L-Lysin bezüglich der NO-Produktion nachweisen. Die Autoren erklären diesen Befund damit, daß die NO-Synthese demnach unabhängig vom L-Arginintransport erfolgt. Zu einem ähnlichen Resultat kamen Allman et al. (1998). Die Autoren wiesen *in vivo* (Schaf) nach, daß die Applikation von L-Lysin (500 mg/kg) keine Senkung des Nitratgehaltes im Serum verursachte und demnach durch L-Lysin die NO-Produktion nicht beeinflusst wurde.

### **5.5 L-Arginyl-L-Arginin und L-Arginyl-L-Leucin**

Der Einsatz der L-Arginin-enthaltenen Dipeptide L-Arg-L-Arg und L-Arg-L-Leu sollte erste Hinweise dahingehend liefern, ob humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen diese als Substrat für die NO-Generierung nutzen können. Dem müsste ein möglicher Transport in die Zelle vorausgehen, um intrazellulär dem Stoffwechsel zur Verfügung zu stehen.

Es wurde bereits *in vivo* am CAM-Hühnerei-Modell gezeigt, daß das Dipeptid L-Arg-L-Arg eine vasoaktive Wirkung aufweist, und zwar zeitlich verzögert im Vergleich zur alleinigen Applikation von L-Arginin (Mitteilung von J. Wohlrab). Dieser vasodilatorische Effekt kann auf eine erhöhte NO-Freisetzung in den Gefäßen des Chorion-Allantois-Membran zurückgeführt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Inkubation über 72 h mit dem Dipeptid eine Erhöhung der NO-Freisetzung in HDMEC hervorrief, allerdings erst bei einer Konzentrationen von 50 mM. Geringere Konzentrationen hatten keinen Einfluß auf den Nitritgehalt. Dies könnte die Schlussfolgerung zulassen, daß Endothelzellen das Dipeptid als L-Argininquelle für die NO-Synthese nutzen. Dennoch konnte in den Untersuchungen keine konzentrationsabhängige Korrelation zwischen L-

Arg-L-Arg und Nitritgehalt ermittelt werden. Notwendige Voraussetzung für eine mögliche Eingliederung in den zellulären Stoffwechsel ist die Aufnahme des Dipeptides in die Zelle. Denkbar wäre eine extrazelluläre Hydrolyse des Dipeptides. Diese mögliche Verwertung von extern zugeführten Peptiden diskutieren Su and Austic (1998). Die einzelnen Aminosäuren werden dann nach der extrazellulären hydrolytischen Spaltung über die bekannten Aminosäuretransporter von der Zelle aufgenommen. Neben dem aus zwei L-Argininmolekülen bestehenden Dipeptid wurde L-Arginyl-L-Leucin untersucht. Dieses Dipeptid führte vor allem bei 10 mM, 25 mM und 50 mM nach 24 h bzw. 72 h zu einer Verringerung der NO-Freisetzung in HDMEC. Die Autoren Su and Austic (1998) untersuchten ebenfalls den Einfluß des Dipeptid auf die NO-Produktion, hier aber an einer Makrophagen-Zelllinie (Huhn). Sie konnten eine verringerte Effektivität des Dipeptides im Vergleich zu L-Arginin bezüglich der Substratverwertung durch die NOS feststellen. Mit Hilfe von „uptake“-Studien zeigten sie, daß L-Arginyl-L-Leucin und auch L-Leucinyl-L-Arginin den Transport von L-Arginin in die Zelle inhibierten, was zu einer verringerten Substratverfügbarkeit von L-Arginin für die NO-Synthase führte.

Ein weiteres Dipeptid, L-Tyrosyl-L-Arginin (Kyotorphin), ist bekannt als endogenes Neuropeptid, das im Gehirn synthetisiert wird und wie viele andere Neuropeptide in der Aufrechterhaltung und Regulation des vaskulären Tonus in der peripheren Zirkulation involviert ist (Bull et al., 1996; Arima et al., 1997). Von Arima et al. (1997) konnte nachgewiesen werden, daß dieses Dipeptid durch spezifische Peptidasen aufgespalten und schließlich L-Arginin als Substrat für die neuronale NO-Synthase genutzt werden kann.

Die Autoren Uemura et al. (2000) publizierten Daten, die ebenfalls eine Modulation der NO-Generierung durch L-Arginin-enthaltene Peptide belegen. Sie testeten Heptamere aus L-Arginin bzw. D-Arginin in Venentransplantaten einerseits bezüglich ihres Einflusses auf die NO-Freisetzung und andererseits hinsichtlich ihres Translokationsvermögens durch die Cytoplasma- und Kernmembran. In Endothelzellen (vaskulär) und in vaskulärem Gewebe konnten sie eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Translokation durch die Membran feststellen, wobei dieser Prozess unter Energieverbrauch abläuft. Somit steht das Heptamer-Peptid intrazellulär als Substrat für die NOS zur Verfügung, was sich in einem deutlichen Anstieg der NO-

Freisetzung zeigte. Interessant war außerdem, daß die Autoren nach intraluminarer Applikation ein sehr gutes Penetrationsvermögen in die Gefäßwand nachweisen konnten, wobei sie weniger den polykationischen Charakter dafür verantwortlich machten, sondern vielmehr die Wirkung der Guanidiniumgruppe des Arginins. Die Autoren diskutieren aufgrund dieser Befunde einen möglichen therapeutischen Einsatz solcher kurzkettigen L-Argininpolymere bei vaskulären Störungen, die durch eine verringerte intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin hervorgerufen werden. Für kationische, langkettige argininhaltige Peptide (Poly-L-Arginin) wird eher ein hemmender Einfluß auf den L-Argintransport und die NO-Generierung beschrieben. Neben Poly-L-Arginin inhibierte in Experimenten mit Rattenmakrophagen auch Poly-L-Lysin die L-Argininaufnahme (Hammermann et al., 1999). Solche kationischen Peptide werden beispielsweise von Eosinophilen sezerniert und spielen unter anderen eine Rolle in der Pathogenese von Bronchialasthma (Hammermann et al., 1999). Auch aktivierte Leukozyten setzen kationische Peptide frei und tragen zur Regulation des vaskulären Tonus bei (Kinoshita and Katusic, 1997). Ferner ist im Plasma eine hohe Konzentration an Aminosäuren, Di- und Oligopeptide zu finden, die als Proteine mit der Nahrung aufgenommen und hydrolysiert werden und im Verdauungstrakt über entsprechende Transporter der Bürstensaummembran („brush border membrane“) in die Blutbahn gelangen (Thamocharan et al., 1997; Fei et al., 2000).

## 5.6 eNOS- und iNOS-Expression

Unter Verwendung von genspezifischen Primern konnte mittels RT-PCR neben der mRNA der endothelialen auch die der induzierbaren NOS-Isoform in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Regulation der Transkription der iNOS (und der anderen Isoformen) in Endothelzellen ist nicht vollständig geklärt (Kolyada and Madias, 2001). Bereits 1999 zeigte die Arbeitsgruppe von Hoffmann et al. (1999) die Expression der iNOS in HDMEC, allerdings nach Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) und dies erst nach einer längeren Behandlungsdauer (48 h, 72 h). Dabei hatte vor allem die simultane Applikation von IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$  eine verstärkte iNOS-Expression zur Folge. In früheren

Studien anderer Arbeitsgruppen wurde die Expression der induzierbaren NOS in mikrovaskulären Ratten- und Rinderendothelzellen untersucht und nachgewiesen (Chakravarthy et al., 1995; Ungureanu-Longrois et al., 1995; Geiger et al., 1997).

Keine NO-Freisetzung durch die NOS trotz Applikation pro-entzündlicher Agenzien wurde in menschlichen Aorta-Endothelzellen (MacNaul and Hutchinson, 1993), in einer menschlichen vaskulären Endothelium-abgeleiteten Hybrid-Endothelzelllinie EA.hy 926 (Schoedon et al., 1993) und in menschlichen Nabelschnur-Endothelzellen (Werner-Felmeyer et al., 1993) detektiert. Den komplexen Mechanismus der Induktion der iNOS in menschlichen Zellen und Geweben zu charakterisieren, ist schwierig. Neben der Bereitstellung von NOS-Enzymmolekülen, die durch die regulierte Proteinbiosynthese gewährleistet wird, ist die Verfügbarkeit der an der NO-Generierung beteiligten essentiellen Cofaktoren (BH<sub>4</sub>, FAD, FMN) und Substrate (L-Arginin, molekularer Sauerstoff, NADPH) von entscheidender Bedeutung (Weinberg et al., 1995; Govers and Rabelink, 2001). Im Zusammenhang mit der Modulation der Enzymaktivität wurde bereits diskutiert, daß *in vitro* im Laufe der Zellkultivierung eine Limitation von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) auftreten kann. Diesen Aspekt berücksichtigen ebenfalls Fuchs et al. (1993), nachdem sie in menschlichen Makrophagen nur eine geringe NOS-Aktivität beobachten konnten.

In unseren Untersuchungen an der Zellkultur wurde durch Applikation des natürlichen Substrates L-Arginin (5-25 mM) eine Zunahme der iNOS-mRNA-Expression in HDMEC nachgewiesen. Nach längeren Inkubationszeiten bewirkte eine Konzentrationssteigerung der Aminosäure keine Erhöhung der iNOS-Transkription in den behandelten Zellen. Die konzentrationsabhängige Stimulation der iNOS-Expression nach 24 h hätte auch eine Steigerung der NO-Freisetzung nach Supplementierung von L-Arginin vermuten lassen. Allerdings konnte im Kulturmedium kein erhöhter Nitritgehalt nach Behandlung mit 5-25 mM L-Arginin (24 h) nachgewiesen werden. Wie bereits im vorherigen Abschnitt aufgeführt, kann eine Erklärung für eine fehlende Steigerung der NO-Produktion trotz vermehrter mRNA-Expression darin bestehen, daß anscheinend die Bedingungen für eine optimale Enzymkatalyse in der Zellkultur nicht bzw. nicht ausreichend gegeben sind. So konnten wir beispielsweise durch Applikation des Cofaktors BH<sub>4</sub> zu HDMEC nach 24 h eine konzentrationsabhängige Steigerung der

NO-Produktion nachweisen, was tatsächlich auf eine reduzierte Verfügbarkeit dieses Cofaktors unter Zellkulturbedingungen schließen lässt.

Die Autoren um Binion et al. (1998) untersuchten die iNOS-Expression in humanen intestinalen mikrovaskulären Endothelzellen (HIMEC) und humanen Nabelschnur-Endothelzellen. Sie stimulierten die Zellen mit TNF- $\alpha$ +LPS. Überraschenderweise detektierten sie anhand von RT-PCR-Analysen in zwei von fünf untersuchten HIMEC-Populationen auch in unbehandelten Proben ein iNOS-Amplifikat, wogegen die makrovaskulären Nabelschnur-Endothelzellen trotz Inkubation mit TNF- $\alpha$ +LPS keine iNOS-mRNA exprimierten. Die Autoren diskutierten als mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt ebenfalls die Zellkulturbedingungen. Anscheinend haben die makrovaskulären Gefäßzellen die Fähigkeit der iNOS-Expression im Zuge der Passagierung verloren (Rosenkranz-Weiss et al., 1994; Bonman et al., 1997; Kaku et al., 1997). Eine mögliche altersbedingte Reduktion der Expression der NOS in Endothelzellen (HUVEC) war außerdem Gegenstand der Untersuchungen von Hoffmann et al. (2001), allerdings nicht die der iNOS, sondern der endothelialen NOS. Dabei wurde festgestellt, daß mit zunehmender Passagenanzahl (bis 14) die endotheliale NO-Produktion sinkt.

Die physiologische Rolle von NO und die Regulation der Expression der NO-Synthase-Isoenzyme in den verschiedenen Zelltypen der Haut war neben der Studie von Hoffmann et al. (1999) auch Forschungsschwerpunkt anderer Arbeitsgruppen. So verglichen Sasaki et al. (2000) UVB-bestrahlte Keratinozyten (Maus) mit unbestrahlten Zellen. Sie detektierten dabei überraschenderweise in den unbehandelten Zellen deutlich eine iNOS-Bande, während die UVB-Bestrahlung zu einer verringerten Expression führte. Demnach ist die Herkunft der untersuchten Zellen innerhalb einer Zellspezies von entscheidender Bedeutung (Sasaki et al., 2000). Vergleichbar mit unseren Befunden bezüglich der gefundenen iNOS-mRNA in mikrovaskulären Endothelzellen sind die Daten von Thuringer et al. (2000). Die Autoren demonstrierten die Präsenz von sowohl eNOS als auch iNOS-mRNA unabhängig vom Kulturstadium und einer Stimulation. Von Sasaki et al. (2000) abweichende Befunde zur iNOS-Expression waren die publizierten Daten von Romero-Graillet et al. (1996); Sirsjö et al. (1996); Weller (1997) und Kuhn et al. (1998). Beispielsweise setzte die Arbeitsgruppe um Sirsjö et al. (1996) gesunde und Psoriasis-geschädigte Hautbiopsien in RT-PCR-Analysen ein. Außerdem

wurden kultivierte Keratinozyten mit IL-1 $\beta$ +TNF- $\alpha$  stimuliert. In den unbehandelten Zellen bzw. den nicht erkrankten Hautarealen konnten sie jeweils keine iNOS-Bande detektieren.

Eine aus dermale Gewebe gewonnene Zellpopulation setzten Wang et al. (1996) ein, um unter anderem die Expression der induzierbaren NOS zu untersuchen. Durch Variation der cDNA-Mengen in der PCR konnten sie in humanen Fibroblasten iNOS-Transkripte erhalten, und zwar unabhängig von einer Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen.

In einer Übersichtsarbeit von Bruch-Gerharz et al. (1998) werden die verschiedenen Regulationsmechanismen der iNOS-Expression zusammengefasst. Während für die inflammatorischen und immunvermittelten Stimulanzen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Nathan and Xie, 1994) eine Induktion der iNOS-Genexpression beschrieben wurde, zählen Glycocorticosteroide, Cyclophiline und Retinoide, aber auch TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-10 (Becherel et al., 1995; Pinsky et al., 1995) zu solchen Faktoren, die die Transkription hemmen oder verringern.

Daten über eine mögliche konzentrationsabhängige Steigerung der iNOS-Transkription durch die Aminosäure L-Arginin als natürliches NOS-Substrat, wie wir sie nachweisen konnten, wurden bisher nicht publiziert.

Neben der induzierbaren NOS wurde in HDMEC die endotheliale Isoform des Enzyms untersucht. Die endotheliale NO-Produktion trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung wichtiger physiologischer Vorgänge, wie zum Beispiel der Vasodilation bei und reguliert dadurch den lokalen Blutfluß (Binion et al., 1998; Bruch-Gerharz et al., 1998). Wir konnten zeigen, daß humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen die eNOS-mRNA exprimierten. Die Transkription war weder zeit- noch konzentrationsabhängig bezüglich des Substrates L-Arginin. Andere Arbeitsgruppen testeten an Endothelzellen den Effekt verschiedener Stimulanzen auf die eNOS-mRNA-Expression. Dabei konnten Binion et al. (1998) an humanen intestinalen mikrovaskulären Endothelzellen (HIMEC) und makrovaskulären Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) zeigen, daß die eNOS-mRNA nicht durch Cytokine (TNF- $\alpha$ ) und LPS-Stimulation beeinflussbar war. Andere Daten über eine Änderung der eNOS-mRNA nach Inkubation mit Zytokinen bzw. LPS deuten dagegen auf einen modulierenden Effekt hin. MacNaul and Hutchinson (1993) beschrieben eine „down“-Regulation der eNOS-Expression in

humanen Aorta-Endothelzellen (AOEC) nach Inkubation mit verschiedenen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) + LPS. Daneben zeigten sie eine Induktion der iNOS in ebenfalls untersuchten humanen glatten Aorta- Muskelzellen. Sie erklären diesen Sachverhalt mit der Fähigkeit vaskulären Gewebes, unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen die NO-Generierung durch die eNOS des Endothelium dann auf die iNOS vermittelte NO-Produktion der Muskelzellen umzuschalten.

Die Applikation von diversen Zytokinkombinationen testeten außerdem Kaku et al. (1997) an vaskulären Rinder-Aorta-Endothelzellen, wobei hier allerdings eine Erhöhung der eNOS-mRNA nach Zytokinstimulation beobachtet wurde.

Eine transkriptionale und posttranslationale Regulation der eNOS-Expression durch Wasserstoffperoxid untersuchten Grant et al. (2000) an Rinder-Aorta-Endothelzellen. Als Resultat konnten sie mittels Northernanalysen eine konzentrations- und zeitabhängige Korrelation zwischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und eNOS-mRNA erhalten. Neben einem steigernden Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Transkription erhöht die Verbindung auch die Stabilität der eNOS-mRNA, was zu einer vermehrten Präsenz von mRNA-Molekülen in der Zelle führt.

Als physikalischer Stimulator der eNOS-Expression wurde von Deliconstantinos et al. (1996b) UVB-Bestrahlung eingesetzt. Dabei zeigten Endothelzellen (Rinderaorta-Endothelzellen) eine vermehrte eNOS-Expression nach 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Der Versuch belegte die Aussage, daß die UV-vermittelte NO-Generierung und die damit einhergehende Vasodilation Schlüsselereignisse einer Erythembildung in der Haut darstellen.

Eine Steigerung der eNOS-Expression in Rinder-Aorta-Endothelzellen durch oxidierte Linolsäure (13-Hydroperoxyoctadecadiensäure, 13-HPODE) konnten Ramasamy et al. (1998) nachweisen. Hintergrund ihrer Arbeit war die bereits von Hirata et al. (1995) aufgezeigte stimulierende Wirkung von geringkonzentriertem oxidierten LDL bezüglich der eNOS-mRNA-Expression, wogegen hohe Konzentrationen eine Abnahme zur Folge hatten. Auch die Inkubation der Endothelzellen mit 13-HPODE (bis 20  $\mu$ M, 24 h) führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der eNOS-mRNA. Dabei konnte zum einen eine Steigerung der Transkriptionsrate der eNOS-Gene und zum anderen eine Erhöhung der eNOS-mRNA-Stabilität und damit der Halbwertszeit, ähnlich wie bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch 13-HPODE, nachgewiesen werden.

Unter natürlichen physiologischen Bedingungen erfolgt die Regulation der eNOS-Expression durch verschiedene Faktoren. Aufgrund der funktionalen Lokalisation der Endothelzellen als Auskleidung der Mikro- und Makrogefäße sind die Zellen permanent dem mechanischen Reiz des zirkulierenden Blutes ausgesetzt. Dieser auf das Endothelium wirkende Reiz wird auch als „shear stress“ bezeichnet und kann über sogenannte „shear stress“-vermittelte Elemente eine Hochregulation der eNOS-Expression verursachen. Außerdem wirken unter anderem Estrogen und Insulin stimulierend auf die Transkription der eNOS-Gene, während Erythropoietin oder Sauerstoffmangel einen hemmenden Effekt zeigen. Einen regulatorischen Einfluß auf die Expression übt auch NO selbst aus. Durch einen sogenannten negativen „feedback“-Mechanismus greift das Molekül regulierend in die eNOS-Expression über einen cGMP-vermittelten Prozeß ein. Die Tatsache, daß eine Diskrepanz zwischen exprimierter eNOS-mRNA, daraus synthetisierter eNOS-Proteinmoleküle und der Enzymaktivität besteht, läßt auf einen komplexen Regulationsmechanismus schließen. Von großer Bedeutung ist dabei neben der Regulation auf Ebene der Transkription auch die posttranskriptionale Expressionskontrolle. Die intrazelluläre Anzahl von mRNA-Molekülen ergibt sich aus dem Verhältnis von Gentranskription und mRNA-Abbau. Wie bereits aufgeführt, können verschiedene biochemische Verbindungen die Halbwertszeit der eNOS-mRNA verlängern, indem die Stabilität erhöht wird, wie zum Beispiel durch VEGF. An der eNOS-mRNA-Degradation beteiligte Faktoren sind dagegen unter anderem TNF- $\alpha$ , LPS oder Sauerstoffmangel. Ferner erfolgt auf co- und posttranslationaler Ebene eine Modifikation der eNOS-Proteine, was zur Gewährleistung von Stabilität und Aktivität führt. Durch die kovalente Anlagerung einer Myristoylgruppe an die Glycingruppe des NH<sub>2</sub>-Endes sind die Voraussetzungen für die Eingliederung in die Plasmamembran gegeben. Mutationen an der Myristoyl-„site“ konnten zeigen, daß diese Modifizierung des eNOS-Proteins essentiell für die membranständige Lokalisation und für die Aktivität des Enzyms ist. Eine posttranslationale Regulation erfolgt über eine Palmitoylation an zwei Cysteinen (15, 26) des NH<sub>2</sub>-Terminus, was die Assoziation des eNOS-Protein in der Membran stabilisiert (Govers and Rabelink, 2001).

## 6 Zusammenfassung

Einen Teilkomplex der vorliegenden Arbeit umfaßte die Etablierung einer Methode zur Isolierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen aus Vorhautgewebe. Basierend auf das von Hewett and Murray (1993) beschriebene Verfahren wurden zur immunomagnetischen Separation anti-CD31-beschichtete Dynabeads eingesetzt, die eine Selektion der Endothelzellen innerhalb der isolierten Mischpopulation vor der Zellaussaat ermöglichen sollte. Dabei konnte eine homogene und subkultivierbare Kultur aus mikrovaskulären Endothelzellen erhalten werden, die anhand von ausgewählten Merkmalen als solche identifiziert wurden. Die Zellen zeigten in der eindimensionalen Kultur die typische „cobblestone“-Struktur. Die Daten der flowzytometrischen Analyse zum von-Willebrand-Faktor belegten außerdem, daß es sich um eine reine Endothelzellkultur handelte. Anhand von Proliferations- und Wachstumsuntersuchungen stellte sich die 2. Passage als optimal heraus, wobei der 5. Kulturtag ein Proliferationsmaximum darstellte. Es kann ausgesagt werden, daß die angewandte Methode zur Isolierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen für die routinemäßige Gewinnung zum Zwecke von *in vitro* Studien eingesetzt werden kann.

Einen zweiten Komplex bildeten Untersuchungen zum L-Arginin/Stickstoffmonoxid-Metabolismus in HDMEC. Als Ziel stand eine Modulation der NO-Generierung, um mögliche Anhaltspunkte für vasodilatorische oder vasokonstriktive Effekte als eventuelle Therapiestrategien zu erhalten.

Die Aktivität der NO-Synthasen wurde anhand des Nitritgehaltes im Kulturüberstand mit der Griess-Reaktion bestimmt. Dabei wurde zum einen L-Arginin, das natürliche Substrat der NOS und zum anderen die Cofaktoren  $\text{Ca}^{2+}$  und Tetrahydrobiopterin hinsichtlich ihres Einflusses auf die NOS-Aktivität eingesetzt.

Die externe Zugabe der Aminosäure L-Arginin führte bis 25 mM (24 h, 48 h, 72 h) zu keiner Änderung des Nitritgehaltes. Die Applikation von 50 mM war zytotoxisch. Da keine konzentrationsabhängige Korrelation bezüglich der NO-Freisetzung festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, daß die zellschädigende Wirkung weniger auf

den drastischen Anstieg von NO zurückzuführen war, sondern daß vielmehr die hohe Konzentration zytotoxisch wirkte.

Durch Supplementierung von  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) konnte nur mit 2 mM (72 h) eine geringe Steigerung der NO-Freisetzung erreicht werden. Nach den anderen Inkubationszeiten (24 h, 48 h) und nach Zugabe von 1 mM (24 h, 48 h, 72 h) wurde keine Erhöhung des Nitritgehaltes detektiert.

Die Zufuhr von Tetrahydrobiopterin führte nach einer 24stündigen Inkubation zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der NO-Produktion. Nach 48 h und 72 h wurde nur noch mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{BH}_4$  ein erhöhter Nitritgehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen.

Neben L-Arginin wurden die kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin an HDMEC getestet. Diese Aminosäuren konkurrieren um das  $\gamma^+$ -Transportsystem. Es konnte gezeigt werden, daß jeweils durch 2 mM eine Abnahme der NO-Freisetzung auftrat, was auf einen hemmenden Effekt von L-Ornithin bzw. L-Lysin bezüglich des L-Arginintransportes zurückzuführen war. Durch Coapplikation von 2 mM L-Lysin + 5 mM L-Arginin bzw. 2 mM L-Ornithin + 5 mM L-Arginin konnte dieser Effekt aufgehoben und der Nitritgehalt der Kontrolle erreicht werden. Weiterführende Untersuchungen, die vor allem „uptake“-Studien mit den Aminosäuren einschließen, sollen den bereits diskutierten Transportmechanismus und seine Regulation in HDMEC untermauern.

Erste Hinweise auf einen modulierenden Einfluß von Dipeptiden hinsichtlich der NO-Produktion wurden durch Untersuchungen mit L-Arginyl-L-Arginin und L-Arginyl-L-Leucin erhalten. Es stellte sich heraus, daß L-Arg-L-Arg die NO-Generation nicht beeinflusste. Die höchste eingesetzte Konzentration führte zwar zu einem drastischen Anstieg des Nitritgehaltes, doch war auch ein zellschädigender Effekt des Dipeptides deutlich zu beobachten. Die Inkubation mit L-Arg-L-Leu rief keine steigernde NO-Freisetzung hervor. Es wurde sogar eine verminderte NO-Generierung festgestellt.

Durch Anwendung molekularbiologischer Methoden (Westernblot- und RT-PCR) wurde in HDMEC die Expression der endothelialen und der induzierbaren NO-Synthase untersucht und nachgewiesen. Die Transkription der iNOS-Gene wurde dabei konzentrationsabhängig durch L-Arginin (bis 25 mM; 24 h) positiv beeinflusst. Eine Änderung der eNOS-Expression durch L-Arginin trat nicht auf.

Somit kann zusammengefaßt werden, daß unter *in vitro*-Bedingungen eine Modulation der NO-Produktion in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (Zellkultur) vor allem über eine Aktivitätssteigerung möglich erscheint und Hinweise darauf liefert, in welchen Ausmaß eine Vasodilation gefördert bzw. gehemmt werden könnte und somit zelluläre Dysfunktionen behoben werden könnten.

## Literaturverzeichnis

1. Abd-El-Aleem S.A., Ferguson M.W.J., Appleton I., Kairsingh S., Jude E.B., Jones K., McCollum C.N., Ireland G.W. (2000) Expression of nitric oxide synthase isoforms and chronic venous leg ulcers. *J Pathol* 191: 434-442
2. Ades E.W., Candal F.J., Swerlick R.A., George V.G., Summers S., Bosse D.C., Lawley T.J. (1992) HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99: 683-690
3. Agner T. & Serup J. (1989) Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. *Contact Dermatitis* 20: 352-359
4. Ahmed B. & van den Oord J.J. (1999) Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions on the skin. *Br J Dermatol* 141: 12-19
5. Ahmed B. & van den Oord J.J. (2000) Expression of inducible isoform of nitric oxide synthase in pigment cell lesions of the skin. *Br J Dermatol* 142: 432-440
6. Aisaka K., Gross S.S., Griffith O.W., Levi R. (1989) L-arginine availability determines the duration of acetylcholine-induced systemic vasodilation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 163(2): 710-717
7. Allman K.G., Stoddart A.P., Young J.D. (1998) Effect of L-lysine on nitric oxide production in ovine endotoxaemia. *Br J Anaesth* 81(2): 188-192
8. Arnal J-F., Münzel T., Venema R.C., James N.L., Bai C-L., Mitch W.E., Harrison D.G. (1995) Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An Effect independent of NO synthase substrat availability. *J Clin Invest* 95: 2565-2572
9. Arima T., Kitamura Y., Nishiya T., Taniguchi T., Takagi H., Nomura Y. (1997) Effects of kyotorphin (L-tyrosyl-L-arginine) on [3H]NG-nitro-L-arginine binding to neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Neurochem Int* 30(6): 605-611
10. Avila-Chavez E., Torres-y-Torres N., Tovar-Palacio A.R. (1997) New concepts in anionic and cationic amino acid transport. *Rev Invest Clin* 49(5): 411-424

11. Babu B.R. & Griffith O.W. (1998) Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 2(4): 491-500
12. Baudouin J.E. & Tachon P. (1996) Constitutive nitric oxide synthase is present in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106: 428-431
13. Becherel P-A., Le Goff L., Ktorza S., Ouaz F., Mencia-Huerta J.M., Dugas B., Debre P., Mossalayi M.D., Arock M. (1995) Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur J Immunol* 25(10): 2992-2995
14. Beck K-F., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Meßmer U.K., Mühl H., Pfeilschifter J. (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 202: 645-653
15. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624
16. Binion D.G., Fu S., Ramanujam K.S., Chai Y.C., Dweik R.A., Drazba J.A., Wade J.G., Ziats N.P., Erzurum S.C., Wilson K.T. (1998) iNOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion. *Am J Physiol* 275: G592-G603
17. Binion D.G., Rafiee P., Ramanujam K.S., Fu S., Fisher P.J., Rivera M.T., Johnson C.P., Otterson M.F., Telford G.L., Wilson K.T. (2000) Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion. *Free Radic Biol Med* 29(9): 881-888
18. Bogle R.G., Baydoun A.R., Pearson J.D., Moncada S., Mann G.E. (1992a) L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem J* 284(Pt1): 15-18
19. Bogle R.G., Moncada S., Pearson J.D., Mann G.E. (1992b) Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter. *Br J Pharmacol* 105: 768-779
20. Bogle R.G., Baydoun A.R., Pearson J.D., Mann G.E. (1996) Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J Physiol* 490(1): 229-241

21. Bonmann E., Suschek C., Spranger M., Kolb-Bachofen V.(1997) The dominant role of exogenous or endogenous interleukin-1 beta on expression and activity of inducible nitric oxide synthase in rat microvascular brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 230(2): 109-112
22. Braverman I.M. (2000) The cutaneous microcirculation. *J Invest Dermatol* 5 (Symposium Proceedings): 3-9
23. Brovkovych V., Stolarczyk E., Oman J., Tombouliau P., Malinski T. (1999) Direct electrochemical measurement of nitric oxide in vascular endothelium. *J Pharm Biomed Anal* 19(1-2): 135-143
24. Bruch-Gerharz D., Fehsel K., Suschek C., Michel G., Ruzicka T., Kolb-Bachofen V. (1996) A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med* 184(5): 2007-2012
25. Bruch-Gerharz D., Ruzicka T., Kolb-Bachofen V. (1998) Nitric oxide in human skin: Current status and future prospects. *J Invest Dermatol* 110:1-7
26. Bruning T.A., Chang P.C., Blauw G.J., Vermeij P., van Zwieten P.A. (1993) Serotonin-induced vasodilatation in the human forearm is mediated by the "nitric oxide-pathway": no evidence for involvement of the 5-HT<sub>3</sub>-receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(1): 44-51
27. Bull H.A., Bunker C.B., Terenghi G., Springall D.R., Zhao Y., Polak J.M., Dowd P.M. (1991) Endothelin-1 in human skin: immunolocalization, receptor binding, mRNA expression, and effects on cutaneous microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 97: 618-623
28. Bull H.A., Hothersall J., Chowdhury N., Cohen J., Dowd P.M. (1996) Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 106: 655-660
29. Bune A.J. & Cook H.T. (1996) Inhibition of tetrahydrobiopterin synthesis reduces nitric oxide production by isolated glomeruli in immune complex glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 4(1). 43-47

30. Bunker C.B., Goldsmith P.C., Leslie T.A., Hayes N., Foreman J.C., Dowd P.M. (1996) Calcitonin gene-related peptide, endothelin-1, the cutaneous microvasculature and Raynaud's phenomenon. *Br J Dermatol* 134(3): 399-406
31. Busconi L. & Michel T. (1993) Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 268(12): 8410-8413
32. Cai J-P., Falanga V., Taylor J.R., Chin Y.H. (1992) Transforming growth factor-beta differentially regulates the adhesiveness of normal and psoriatic dermal microvascular endothelial cells for peripheral blood mononuclear cells. *J Invest Dermatol* 98: 405-409
33. Cendan J.C., Souba W.W., Copeland E.M-3erd, Lind D.S: (1996) Increased L-arginine transport in a nitric oxide-producing metastatic colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol* 3(5): 501-508
34. Chakravarthy U., Stitt A.W., McNally J., Bailie J.R., Hoey E.M., Duprex P. (1995) Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 14(4): 285-294
35. Chan V.T., Zhang D.N., Nagaravapu U., Hultquist K., Romero L.I., Herron G.S. (1998) Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells: Expression and morphogenetic correlation. *J Invest Dermatol* 111: 1153-1159
36. Chang C.-I., Liao J.C., Kuo L. (2001) Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Research* 61: 1100-1106
37. Chen T.R. (1977) In situ demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 104: 255-262
38. Christensen H.N. & Antonioli J.A. (1996) Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na<sup>+</sup>-dependent inhibition of Na<sup>+</sup>-independent transport. *J Biol Chem* 25: 1497-1504
39. Closs E.I., Scheld J-S., Sharafi M., Förstermann U. (2000) Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: Role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 57: 68-74

40. Clough G.F., Bennett A.R., Church M.K. (1998) Measurement of nitric oxide concentration in human skin *in vivo* using dermal microdialysis. *Exp Physiol* 83(3): 431-434
41. Clough G.F. (1999) Role of nitric oxide in the regulation of microvascular perfusion in human skin *in vivo*. *J Physiol* 516(2): 549-557
42. Coffman J.D. (1994) Effects of endothelium-derived nitric oxide on skin and digital blood flow in human. *Am J Physiol* 267(6): H2087-H2090
43. Collarani E.J. & Oxender D.L. (1987) Mechanisms of transport of amino acids across membranes. *Ann Rev Nutr* 7: 75-90
44. Cooke J.P., Andon N.A., Girerd X.J., Hirsch A.T., Creager M.A. (1991a) Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 83(3): 1057-1062
45. Cooke J.P., Dzau J., Creager A. (1991b) Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine. *Basic Res Cardiol* 86(2): 173-181
46. Colletuori D.M. & Ash D.E. (2001) Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochem* 40(31): 9356-9362
47. Cornelius L.A., Sepp N., Li L.-J., Degitz K., Swerlick R.A., Lawley T.J., Caughman S.W. (1994) Selective upregulation of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) by ultraviolet B in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 103: 23-28
48. Creager M.A., Gallagher S.J., Girerd X.J., Coleman S.M., Dzau V.J., Cooke J.P. (1992) L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 90(4): 1248-1253
49. Culcasi M., Lafon-Cazal M., Pietri S., Bockaert J. (1994) Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J Biol Chem* 269(17): 12589-12593
50. Cynober L. (1994) Can arginine and ornithine support gut functions? *Gut* 35(1): S42-45

51. Dall'Asta V., Bussolati O., Sala R., Rotoli B.M., Sebastio G., Sperandio M.P., Andria G., Gazzola G.C. (2000) Arginine transport through system  $y^+L$  in cultured human fibroblasts: normal phenotype of cells from LPI subjects. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1829-C1837
52. Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J.C. (1995) Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in cholesterol enriched endothelial cell membranes. *Biochem Pharmacol* 49(11): 1589-1600
53. Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J.C. (1996a) Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation: potential role for peroxynitrite in skin inflammation. *Biochem Pharmacol* 51(12): 1727-1738
54. Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J.C. (1996b) Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Exp Physiol* 81(6): 1021-1033
55. Detmar M., Tenorio S., Hettmannsperger U., Ruszczak Z., Orfanos C.E. (1992) Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *J Invest Dermatol* 98: 147-153
56. Deves R. & Boyd C.A.R. (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function. *Pharmacol Reviews* 78(2): 287-545
57. Dolinska M. & Albrecht J. (1998) L-arginine uptake in rat cerebral mitochondria. *Neurochem Int* 33(3): 233-236
58. Drexler H., Zeiher A.M., Meinzer K., Just H. (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 338: 1546-1550
59. Drummond G.R., Cai H., Davis M.E., Ramasamy S., Harrison D.G. (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86: 347-354
60. Dudasek A., Röschinger W., Muntau A.C., Seidel J., Leupold D., Thöny B., Blau N. (2001) Molecular analysis and long-term follow-up of patients with different forms of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Eur J Pediatr* 160: 267-276

61. Escobales N., rivera-Correa M., Altieri P.I., Rodriguez J.E. (2000) Relationship between NO synthesis, arginine transport, and intracellular arginine levels in vascular smooth muscle cells. *Amino Acids* 19(2): 451-468
62. Fei Y-J., Sugawara M., Liu J-C., Li H.W., Ganapathy V., Ganapathy M.E., Leibach F.H. (2000) cDNA structure, genomic organization, and promotor analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim Biophys Acta* 1492: 145-154
63. Figueroa X.F., Martinez A.D., Gonzales D.R., Jara P.I., Ayala S., Boric M.P. (2001) In vivo assessment of microvascular nitric oxide production and its relation with blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1222-H1231
64. Folkman J. & Haudenschild C. (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-556
65. Frank R., Adelman-Grill B.C., Herrmann K., Haustein U.F., Petri J.B., Heckmann M. (1996) Transforming growth factor- $\beta$  controls cell-matrix interaction of microvascular dermal endothelial cells by downregulation of integrin expression. *J Invest Dermatol* 106: 36-41
66. Frank S., Madlener M., Pfeilschifter J., Werner S. (1998) Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* 111(6): 1058-1064
67. Frank S., Stallmeyer B., Kämpfer H., Kolb N., Pfeilschifter J. (1999) Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J* 13: 2002-2014
68. Frank S., Kämpfer H., Wetzler C., Stallmeyer B., Pfeilschifter J. (2000) Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: A regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J* 347: 265-273
69. Fritsch P. (1998) Dermatologie und Venerologie; Lehrbuch und Atlas. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
70. Fuchs D., Weiss G., Wachter H. (1993) Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 101(1): 1-6

71. Fukuchi M., Watanabe J., Kumagai K., Katori Y., Baba S., Fukuda K., Yagi T., Iguchi A., Yokoyama H., Miura M., Kagaya Y., Sato S., Tabayashi K., Shirato K. (2001) *J Am Coll Cardiol* 37(5): 1436-1442
72. Fukumoto Y., Shimokawa H., Kozai T., Kadokami T., Kuwata K., Yonemitsu Y., Kuga T., Egashira K., Sueishi K., Takeshita A. (1997) Vasculoprotective role of nitric oxide synthase at inflammatory coronary lesions induced by chronic treatment with interleukin-1 $\beta$  in pigs in vivo. *Circulation* 96: 3104-3111
73. Galley H.F., Le Cras A.E., Yassen K., Grant I.S., Webster N.R. (2001) Circulation tetrahydrobiopterin concentrations in patients with septic shock. *Br J Anaest* 86(4): 578-580
74. Geiger M., Stone A., Mason S.N., Oldham K.T., Guice K.S. (1997) Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol* 273: L275-L281
75. George F., Brisson C., Poncelet P., Laurent J.C., Massot O., Arnoux D., Ambrosi P., Klein-Soyer C., Cazenave J.P., Sampol J. (1992) Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads. *Thromb Haemost* 67(1): 147-153
76. Gille J., Swerlick R.A., Lawley T.J., Caughman S.W. (1996) Differential regulation of vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription by tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\alpha$  in dermal microvascular endothelial cells. *Blood* 87(1): 211-217
77. Gille J., Paxton L.L.L., Lawley T.J., Caughman S.W., Swerlick R.A. (1997) Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest* 99: 492-500
78. Girerd X.J., Hirsch A.T., Cooke J.P., Dzau V.J., Creager M.A. (1990) L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 67(6): 1301-1308
79. Goetz R.M., Thatte H.S., Prabhakar P., Cho M.R., Michel T., Golan D.E. (1999) Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2788-2793

80. Goldsmith P.C., Leslie T.A., Hayes N.A., Levell N.J., Dowd P.M., Foreman J.C. (1996) Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *J Invest Dermatol* 106: 113-118
81. Goligorsky M.S, Noiri E., Tsukahara H., Budzikowski A.S., Li H. (2000) A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction. *Acta Physiol Scand* 168: 33-40
82. Gori T., Burstein J.M., Ahmed S., Miner S.E.S., Al-Hesayen A., Kelly S., Parker J.D. (2001) Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation* 104: 1119-1123
83. Gosink E.C. & Forsberg E.J. (1993) Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca<sup>2+</sup> homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am J Physiol* 265(6): C1620-C1629
84. Govers R. & Rabelink T.J. (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F193-F206
85. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1): 131-138
86. Gupta K., Ramakrishnan S., Browne P.V., Solovey A., Hebbel R.P. (1997) A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented condition: Isolation by panning and stimulation with vascular endothelial growth factor. *Exp Cell Res* 230: 244-251
87. Hammermann R., Hirschmann J., Hey C., Mössner J., Folkerts G., Nijkamp F.P., Wessler I., Racké (1999) Cationic proteins inhibit L-arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 155-162
88. Harrison D.G. (1997) Perspective series: nitric oxide and nitric oxide synthase; cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100(9): 2153-2157
89. Hassan A.S. & Milner J.A. (1981) Alterations in nucleic acid and nucleotides in arginine deficient rats. *Metabolism* 30: 739-744

90. Heckmann M., Eberlein-König B., Wollenberg A., Przybilla B., Plewig G. (1994) Ultraviolet-A radiation induces adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Br J Dermatol* 131: 311-318
91. Heckmann M., Pirthauer M., Plewig G. (1997) Adhesion of leukocytes to dermal endothelial cells is induced after single-dose, but reduced after repeated doses of UVA. *J Invest Dermatol* 109: 710-715
92. Heitzer T., Krohn K., Albers S., Meinertz T. (2000) Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetol* 43: 1435-1438
93. Heller R., Unbehaun A., Schellenberg B., Mayer B., Werner-Felmayer G., Werner E.R. (2001) L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthase via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 276(1): 40-47
94. Hewett P.W. & Murray J.C. (1993) Immunomagnetic purification of human microvessel endothelial cells using Dynabeads coated monoclonal antibodies to PECAM-1. *Eur J Cell Biol* 62: 451-454
95. Hewett P.W. & Murray J.C. (1993)[Review] Human microvessel endothelial cells: Isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Biol*: 823-830
96. Hibbs J.B.(jr), Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157(1): 87-94
97. Hibbs J.B.(jr), Westenfelder C., Taintor R., Vavrin Z., Kablitz C., Baranowski R.L., Ward J.H., Menlove R.L., McMurry M.P., Kushner J.P., Samlowski W.E. (1992) Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 89: 867-877
98. Higman D.J., Strachan A.M.J., Buttery L., Hicks R.C.J., Springall D.R., Greenhalgh R.M., Powell J.T. (1996) Smoking impairs the activity of endothelial nitric oxide synthase in saphenous vein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 546-552
99. Hirata K-I., Miki n., Kuroda Y., Sakoda T., Kawashima S, Yokoyama M. (1995) Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 76: 958-962

100. Hoffmann G., Schobersberger W., Rieder J., Smolny M., Seibel M., Fürhapter C., Fritsch P., Sepp N. (1999) Human dermal microvascular endothelial cells express inducible nitric oxide synthase in vitro. *J Invest Dermatol* 112: 387-390
101. Hoffmann J., Haendeler J., Aicher A., Rössig L., Vasa M., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2001) Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli; important role of nitric oxide. *Circ Res* 89: 709-715
102. Hoshida R., Ikeda Y., Karashima S., Matsuura T., Komaki S., Kishino T., Niikawa N., Endo F., Matsuda I. (1996) Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of human cationic amino acid transporter 2 (HCAAT2). *Genomics* 38: 174-178
103. Huang H., Martasek P., Roman L J., Silverman R.B. (2000) Synthesis and evaluation of peptidomimetics as selective inhibitors and active site probes of nitric oxide synthases. *J Med Chem* 43: 2938-2945
104. Ioannidis I., Bätz M., Kirsch M., Korth H-G., Sustmann R., De Groot H. (1998) Low toxicity of nitric oxide against endothelial cells under physiological oxygen partial pressures. *Biochem J* 329: 425-430
105. Jackson C.J., Garbett P.K., Nissen B., Schrieber L. (1990) Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *J Cell Sci* 96: 257-262
106. Jenkins D.C., Charles I.G., Thomsen L.L., Moss D.W., Holmes L.S., Baylis S.A., Rhodes P., Westmore K., Emson P.C., Moncada S. (1995) Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4392-4396
107. Jiang J., Valen G., Touno S., Thoren P., Pernow J. (2000) endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br J Pharmacol* 131(7): 1255-1261
108. Johns D.G., Dorrance A.M., Tramontini N.L., Webb R.C. (2001) Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function. *Exp Biol Med* 226(1): 27-31

109. Joshi M., Fuller L.R., Batchelor G.C. (1999) L-arginine metabolites regulate DNA synthesis and nitric oxide synthase activity in human dermal microvascular endothelial cells-Potential positive and negative regulators of angiogenesis derived from L-arginine. *Cancer Invest* 17(4): 235-244
110. Jude E.B., Boulton A.J.M., Ferguson M.W.J., Appleton I. (1999) The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: Possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1. *Diabetologia* 42: 748-757
111. Kagoura M., Matsui C., Toyoda M., Morohashi M. (2001) Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in skin cancer. *J Cutan Pathol* 28: 476-481
112. Kaku Y., Nanri H., Sakimura T., Ejima K., Kuroiwa A., Ikeda M. (1997) Differential induction of constitutive and inducible nitric oxide synthases by distinct inflammatory stimuli in bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Acta* 1356(1): 43-52
113. Kane A.J., Barker J.E., Mitchell G.M., Theile D.R., Romero R., Messina A., Wagh M., Fraulin F.O., Morrison W.A., Stewart A.G. (2001) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol* 132(8): 1631-1638
114. Kanitakis J. (1998) Immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 8: 539-547
115. Kanner J., Harel S., Granit R. (1992) Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids* 27(1): 46-49
116. Kaposzta Z., Baskerville P.A., Madge D., Fraser S., Martin J.F., Markus H.S. (2001) L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation* 103: 2371-2375
117. Katugampola R., Church M.K., Clough G.F. (2000) The neurogenic vasodilator response to endothelin-1: a study in human skin in vivo. *Exp Physiol* 85(6): 839-846
118. Katusic Z.S. (2001) Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H981-986

119. Kellogg D.L.(jr), Crandall C.G., Liu Y., Charkoudian N., Johnson J.M. (1998) Nitric oxide and cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J Appl Physiol* 85(3): 824-829
120. Kellogg D.L.(jr.), Liu Y., Kosiba I.F., O'Donnell D. (1999) Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol* 86(4): 1185-1190
121. Kelm M., Feelisch M., Krebber T., Motz W., Strauer B.E. (1993) Mechanisms of histamine-induced coronary vasodilatation-H1-receptor-mediated release of endothelium-derived nitric oxide. *J Vasc Res* 30(3): 132-138
122. Ketteler M., Border W.A., Noble N.A. (1994) Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol* 267: F197-F207
123. Khan F., Litchfield S.J., McLaren M., Veale D.J., Littleford R.C., Belch J.J. (1997) Oral L-arginine supplementation and cutaneous vascular responses in patients with primary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 40(2): 352-357
124. Kinoshita H. & Katusic Z.S. (1997) Nitric oxide and effects of cationic polypeptides in canine cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 17(4): 470-480
125. Kleber H-P. & Schlee D. (1991) Allgemeine und funktionelle Biochemie. Teil 1. 2. überarbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena
126. Kluger M.S., Johnson D.R., Pober J.S. (1996) Mechanism of sustained E-selectin expression in cultured human dermal endothelial cells. *J Immunol* 158: 887-896
127. Knowles R.G. & Moncada S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* 17(10): 399-402
128. Kolyada A.Y. & Madias N.E. (2001) Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1beta in endothelial cells. *Mol Med* 7(5): 329-343
129. Kubes P. (1995) Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. *Microcirculation* 2(3): 235-244
130. Kubes P. (2000) Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 47: 6-9

131. Kurz S. & Harrison D.G. (1997) Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest* 99(3): 369-370
132. Laursen J.B., Somers M., Kurz S., McCann L., Warnholtz A., Freeman B.A., Tarpey M., Fukai T., Harrison D.G. (2001) Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice; implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103: 1282-1288
133. Lee K.H., Lawley T.J., Xu Y., Swerlick R.A. (1992) VCAM-1, ELAM-1, and ICAM-1-independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 98: 79-85
134. Lee K-H., Bang D., Choi E-S., Chun W.H., Lee E-S., Lee S. (1999) Presence of circulating antibodies to a disease-specific antigen on cultured human dermal microvascular endothelial cells in patients with Behcet's disease. *Arch Dermatol Res* 291: 374-381
135. Lee S-C., Lee J-W., Jung J.E., Lee H-W., Chun S.D., Kang I.K., Won Y.H., Kim Y.P. (2000a) Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxydation in ultraviolet B-irradiated skin. *Br J Dermatol* 142: 653-659
136. Lee P.C., Kibbe M.R., Schuchert M.J., Stolz D.B., Watkins S.C., Griffith B.P., Billiar T.R., Shears L.L (2000b) Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. *Microvasc Res* 60(3): 269-280
137. Liaudet L., Gnaegi A., Rosselet A., Markert M., Boulat Ol., Perret C., Feihl F. (1997) Effect of L-lysine on nitric oxide overproduction in endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 122: 742-748
138. Lindsey K.Q., Caughman S.W., Olerud J.E., Bunnett N.W. (2000) Neural regulation of endothelial cell-mediated inflammation. *J Invest Dermatol* 5 (Symposium Proceedings): 74-78
139. MacNaul K.L. & Hutchinson N.I. (1993) Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 196(3): 1330-1334

140. Marinos R.S., Zhang W., Wu G., Kelly K.A., Meininger C.J. (2001) Tetrahydrobiopterin levels regulate endothelial proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H482-H489
141. Marui N., Offermann M.K., Swerlick R., Kunsch C., Rosen C.A., Ahmad M., Alexander R.W., Medford R.M. (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92: 1866-1874
142. Mason J.C., Yarwood H., Tarnok A., Sugars K., Harrison A.A., Robinson P.J., Haskard D.O. (1996) Human Thy-1 is cytokine-inducible on vascular endothelial cells and is a signaling molecule regulated by protein kinase C. *J Immunol* 157:874-883
143. Mason J.C., Yarwood H., Sugars K., Haskard D.O. (1997) Human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells show heterogeneity in response to PKC activation. *Am J Physiol* 273: C1233-C1240
144. McDonald K.K., Zharikov S., Block E.R., Kilberg M.S. (1997) A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 272(50): 31213-31216
145. Meininger C.J., Marinos R.S., Hatakeyama K., Martinez-Zaguilan P., Rojas J.D., Kelly K.A., Wu G. (2000) Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 349: 353-356
146. Michel T. & Feron O. (1997) Perspective series: nitric oxide and nitric oxide synthases; Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100(9): 2146-2152
147. Milstien S. & Katusic Z. (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263(3): 681-684
148. Minson C.T., Berry L.T., Joyner M.J. (2001) Nitric oxide and neuronally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol* 91: 1619-1626

149. Mugge A., Peterson T., Harrison D.G. (1991) Release of nitrogen oxides from cultured bovine aortic endothelial cells is not impaired by calcium channel antagonists. *Circulation* 83(4): 1404-1409
150. Nathan C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064
151. Nathan C. & Xie Q.W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78(6): 915-918
152. Noon J.P., Haynes W.G., Webb D.J., Shore A.C. (1996) Local inhibition of nitric oxide generation in man reduces blood flow in finger pulp but not in hand dorsum skin. *J Physiol* 490(2): 501-508
153. Örem A., Aliyazicioglu R., Kiran E., Vanizor B., Cimmocodit G., Deger O. (1997) The relationship between nitric oxide production and activity of the disease in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 133: 1606-1607
154. Ormerod A.D., Weller R., Copeland P., Benjamin N., Ralston S.H., Grabowski P., Herriot R. (1998) Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 290: 3-8
155. Ormerod A.D., Copeland P., Shah S.A.A. (2000) Treatment of psoriasis with topical N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Br J Dermatol* 142: 985-990
156. Özmeric N., Elgün S., Uraz A. (2000) Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Invest* 4: 21-24
157. Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J.A., Sessa W.C. (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100(12): 3131-3139
158. Petzelbauer P., Bender J.R., Wilson J., Pober J.S. (1993) Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol* 151(9): 5062-5072
159. Pinsky D.J., Cai B., Yang X., Rodriguez C., Sciacca R.R., Cannon P.J. (1995) The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked

- by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest* 95(2): 677-685
160. Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H., Rosen G.M. (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267(34): 24173-24176
161. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. (1991a) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266(7): 4244-4250
162. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. (1991b) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288(2): 481-487
163. Radi R., Rodriguez M., Castro L., Telleri R. (1994) Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308(1): 89-95
164. Ramasamy S., Parthasarathy S., Harrison D.G. (1998) Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res* 39: 268-276
165. Rhodes P., Barr C.S., Struthers A.D. (1996) Arginine, lysine and ornithin as vasodilators in the forearm of man. *Eur J Clin Invest* 26: 325-331
166. Richard L., Velasco P., Detmar M. (1998) A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 240: 1-6
167. Rocha I.M. & Guillo L.A. (2001) Lipopolysaccharide and cytokines induce nitric oxide synthase and produce nitric oxide in cultured normal human melanocytes. *Arch Dermatol Res* 293: 245-248
168. Romero-Graillet C., Aberdam E., Clement M., Ortonne J-P., Ballotti R. (1996) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 99: 635-642
169. Rosenkranz-Weiss P., Sessa W.C., Milstien S., Kaufman S., Watson C.A., Pober J.S. (1994) Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels

- enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest* 93(5): 2236-2243
170. Rossi A., Catani M.V., Candi E., Bernassola F., Pudda P., Melino G. (2000) Nitric oxide inhibits cornified envelope formation in human keratinocytes by inactivating transglutaminases and activating protein 1. *J Invest Dermatol* 115: 731-739
171. Rossitch E.(jr.), Alexander E (3erd), Black P.M., Cooke J.P. (1991) L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 87(4): 1295-1299
172. Roth E., Steininger R., Winkler S., Längle F., Grünberger T., Függer R., Mühlbacher F. (1994) L-arginine deficiency after liver transplantation as a effect of arginase efflux from the graft. *Transplantation* 57(5): 665-669
173. Ruszczak Z., Detmar M., Imcke E., Orfanos C.E. (1990) Effects of rIFN alpha, beta, and gamma on the morphology, proliferation, and cell surface antigen expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *J Invest Dermatol* 95: 693-699
174. Ruubo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269(42): 26066-26075
175. Saito T., Pelletier M.P., Shennib H., Giaid A. (2001) Nitric oxide system in needle-induced transmural revascularization. *Ann Thorac Surg* 72(1): 129-136
176. Sakai M., shimizu Y., Nagatsu I., Ueda H. (1996) Immunohistochemical localization of NO synthases in normal human skin and psoriasis skin. *Arch Dermatol Res* 288: 625-627
177. Salvemini D., Wang Z-Q., Wyatt P.S., Bourdon D.M., Marino M.H., Manning P.T., Currie M.G. (1996) Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 118: 829-838
178. Sasaki M., Yamaoka J., Miyachi Y. (2000) The effect of ultraviolet B irradiation on nitric oxide synthase expression in murine keratinocytes. *Exp Dermatol* 9:417-422

179. Schallreuter K.U., Wood J.M., Ziegler I., Lemke K.R., Pittelkow M.R., Lindsey N.J., Gutlich M. (1994) Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. *Biochim Biophys Acta* 1226(2): 181-192
180. Schoedon G., Schneemann M., Blau N., Edgell C.J., Schaffner A. (1993) Modulation of human endothelial cell tetrahydrobiopterin synthesis by activating and deactivating cytokines: new perspectives on endothelium-derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 196(3): 1343-1348
181. Schwartz I.F., Schwartz D., Wollman Y., Chernichowski T., Blum M., Levo Y., Iana A. (2001) Tetrahydrobiopterin augments arginine transport in rat cardiac myocytes through modulation of CAT-2 mRNA. *J Lab Clin Med* 137(5): 356-362
182. Segel G.B., Tometsko A.M., Lichtman M.A. (1995) Y<sup>+</sup>- and L-system amino acid transport in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes: photoinhibition by fluoronitrophenylazide. *Arch Biochem Biophys* 242: 347-354
183. Selamnia M., Robert V., Mayeur C., Delpal S., Blachier F. (1998) De novo synthesis of arginine and ornithine from citrullin in human colon carcinoma cells : metabolic fate of L-ornithine. *Biochim Biophys Acta* 1425(1): 93-102
184. Sepp N.T., Gille J., Li L.J., Caughman S.W., Lawley T.J., Swerlick R.A. (1994) A factor in human plasma permits persistent expression of E-selectin by human endothelial cells. *J Invest Dermatol* 102: 445-450
185. Shastry S., Minson C., Wilson S.A., Dietz N.M., Joyner M.J. (2000) Effects of atropine and L-NAME on cutaneous blood flow during body heating in humans. *J Appl Physiol* 88: 467-472
186. Shaul P.W., North A.J., Wu L.C., Wells L.B., Brannon T.S., Lau K.S., Michel T., Margraf L.R., Star R.A. (1994) Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 94: 2231-2236
187. Shi H.P., Efron D.T., Most D., Tantry U.S., Barbul A. (2000) Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* 128: 374-378
188. Shimizu Y., Sakai M., Umemura Y., Ueda H. (1997) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of

- endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 24(2): 80-87
189. Shinozaki K., Nishio Y., Okamura T., Yoshida Y., Maegawa H., Kojima H., Masada M., Toda N., Kikkawa R., Kashiwagi A. (2000) Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res* 87: 566-573
190. Singh R., Pervin S., Karimi A., Cederbaum S., Chaudhuri G. (2000) Arginase activity in human breast cancer cell lines: N<sup>0</sup>-Hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Research* 6: 3305-3312
191. Sirsjö A., Karlsson M., Gidlöf A., Rollman O., Törmä H. (1996) Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol* 134: 643-648
192. Sobrevia L., Nadal A., Yudilevich D.L., Mann G.E. (1996) Activation of L-arginine transport (system y<sup>+</sup>) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol* 490(3): 775-781
193. Stallmeyer B., Kämpfer H., Kolb N., Pfeilschifter J., Frank S. (1999) The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 113: 1090-1098
194. Stefano G.B. & Magazine H.I. (2001) Nitric oxide autoregulation and its significance. *Mod Asp Immunobiol* 1(5): 182-186
195. Stevens B.R., Kakuda D.K., Yu K., Waters M., Vo C.B., Raizada M.K. (1996) Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. *J Biol Chem* 271: 24017-24022
196. Su C.L. & Austic R.E. (1998) The utilization of dipeptides containing L-arginine by chicken macrophages. *Poult Sci* 77(12): 1852-1857
197. Sumi-Ichinose C., Urano F., Kuroda R., Ohye T., Kojima M., Tazawa M., Shiraishi H., Hagino Y., Nagatsu T., Nomura T., Ichinose H. (2001) Catecholamines and serotonin are differently regulated by tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 276: 41150-41160

198. Sun H., Patel K.P., Mayhan W.G. (2001) Tetrahydrobiopterin, a cofactor for NOS, improves endothelial dysfunction during chronic alcohol consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1863-1869
199. Suschek C.V., Krischel V., Bruch-Gerharz D., Berendji D., Krutmann J., Kröncke K-D., Kolb-Bachofen V. (1999) Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J Biol Chem* 274(10): 6130-6137
200. Swerlick R.A., Garcia-Gonzalez E., Kubota Y., Xu Y., Lawley T.J. (1991) Studies of the modulation of MHC antigen and cell adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 97: 190-196
201. Swerlick R.A., Brown E.J., Xu Y., Lee K.H., Manos S., Lawley T.J. (1992) Expression and modulation of the vitronectin receptor on human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 99: 715-722
202. Swerlick R.A. & Lawley T.J. (1993) Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J Invest Dermatol* 100: 111S-115S
203. Taylor P.D. & Poston L. (1994) The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol* 113(3): 801-808
204. Teng B-Q., Murthy K.S., Kuemmerle J.F., Grider J.R., Sase K., Michel T., Makhlof G.M. (1998) Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 275: G342-G351
205. Thamotharan M., Lombardo Y.B., Bawani S.Z., Adibi S.A. (1997) An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J Biol Chem* 272(18): 11786-11790
206. Thuringer D., Rucker-Martin C., Frelin C. (2000) Cardiac capillary release biologically active nitric oxide at an early stage of in vitro development. *Cardiovasc Res* 47(4): 726-736
207. Tiefenbacher C.P., Bleeke T., Vahl C., Amann K., Vogt A., Kübler W. (2000) Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 102: 2172-2179

208. Tiefenbacher C.P. (2001) Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol* 280: H2484-H2488
209. Ueda S., Matsuoka H., Miyazaki H., Usui M., Okuda S., Imaizumi T. (2000) Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 35(1): 71-75
210. Uemura S., Fathman C.G., Rothbard J.B., Cooke J.P. (2000) Rapid and efficient vascular transport of arginine polymers inhibits myointimal hyperplasia. *Circulation* 102: 2629-2635
211. Ungureanu-Longrois D., Balligand J.L., Kelly R.A., Smith T.W. (1995) Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 27(1): 155-167
212. Vam Winkle L.J., Campione A.C., Gorman J.M. (1988) Na<sup>+</sup>-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 263: 3150-3163
213. Van Hinsbergh V.W.M. (2001) NO or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for endothelium-dependent vasorelaxation; tetrahydrobiopterin makes the difference. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 719-721
214. Vasquez-Vivar J., Whittsett J., Martasek P., Hogg N., Kalyanaraman B. (2001) Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxide: EPR-kinetic analysis and characterization of the pteridine radical. *Free Radic Biol Med* 31(8): 975-985
215. Vasta V., Meacci E., Farnararo M., Bruni P. (1995) Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 206(3): 878-884
216. Villiotou V. & Deliconstantinos G. (1995) Nitric oxide, peroxy-nitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet A (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Res* 15: 931-942

217. Wallengren J. & Larsson B. (2001) Nitric oxide participates in prick test and irritant patch test reactions in human skin. *Arch Dermatol Res* 293: 121-125
218. Walter R., Blau N., Kierat L., Schoedon G., Reinhart W. H. (2000) Systemic tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) levels and coronary artery disease. *Cardiology* 94: 265-266
219. Wang R., Ghahary A., Shen Y.J., Scott P.G., Tredget E.E. (1996) Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol* 106: 419-427
220. Wayte J., Buckingham J.C., Cowall A.M. (1996) [3H]L-arginine transport and nitric oxide synthase activity in foetal hypothalamic cultures. *Neuroreport* 8(1): 267-271
221. Weinberg j.B., Misukonis M.A., Shami P.J., Mason S.N., Sauls D.L., Dittman W.A., Wood E.R., Smith G.K., McDonald B., Bachus K.E, et al. (1995) Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86(3): 1184-1195
222. Weller R. (1999) Nitric oxide, skin growth and differentiation: more questions than answers? *Clin Exp Dermatol* 24: 388-391
223. Wenzel R.R., Bruck H., Baumgart D., Oldenburg O., Erbel R., Philipp T. (1999) Skin microcirculation in healthy subjects and patients with arteriosclerosis. *Herz* 24(7): 576-589
224. Werner-Fellmayer W., Werner E.R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Schmidt K., Weiss G., Wachter H. (1993) Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 268(3): 1842-1846
225. White M.F. & Christensen H.N. (1982) The two-way flux of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells is largely explained by a single transport system. *J Biol Chem* 257(17): 10069-10080
226. White M.F., Gazzola G.C., Christensen H.N. (1982) Cationic amino acid transport into cultured animal cells. *J Biol Chem* 257(8): 4443-4449

227. Wink D.A., Osawa Y., Darbyshire J.F., Jones C.R., Eshenauer S.C., Nims R.W. (1993) Inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide and nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 300(1): 115-123
228. Wohlrab J. & Marsch Ch. (1999) Charakterisierung des Ausmaßes und der Dynamik der vasoaktiven Wirkung von L-Arginin und L-Leucinyl-L-Arginin am CAM-Hühnerei-Modell. *Dermatosen* 47: 19
229. Woll E., Weiss G., Fuchs D., Lang F., Wachter H. (1993) Effect of pteridine derivatives on intracellular calcium concentration in human monocytic cells. *FEBS Lett* 318(3): 249-252
230. Xiao S., Wagner L., Mahaney J., Baylis C. (2001) Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. *Am J Renal Physiol* 280: F989-F995
231. Xu X., Star R.A., Tortorici G., Muallem S. (1994a) Depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate  $Ca^{2+}$  influx. *J Biol Chem* 269(17): 12645-12653
232. Xu Y., Swerlick R.A., Sepp N., Bosse D., Ades E.W., Lawley T.J. (1994b) Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 102: 833-837
233. Xu X., Zeng W., Diaz J., Lau K.S., Gukovskaya A.C., Brown R.J., Pandol S.J., Muallem S. (1997) nNOS and  $Ca^{2+}$  influx in rat pancreatic acinar and submandibular salivary gland cells. *Cell Calcium* 22(3): 217-228
234. Yamawaki H., Sato K., Hori M., Ozaki H., Nakamura S.-I., Nakayama H., Doi K., Karaki H. (1999) Impairment of EDR by a long-term PDGF treatment in organ-cultured rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* 277: H318-H323
235. Yoshiba S., Lee Y.-H., Hassan M., Shoji T., Onuma K., Hasegawa H., Nakagawa H., Serizawa S., Amayasu H. (2001) Parallel induction of nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in alveolar macrophages. *Respiration* 68: 299-306
236. Yu P.K., Yu D.Y., Cringle S.J., Su E.N. (2001) Tetrahydrobiopterin reverses the impairment of acetylcholin-induced vasodilatation in diabetic ocular microvasculatur. *J Ocul Pharmacol Ther* 17(2): 123-129

237. Zanetti M., Katusic Z.S., O'Brien T. (2000) Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Vasc Res* 37: 449-456
238. Zharikov S.I., Herrera H., Block E.R., (1997) Role of membrane potential in hypoxic inhibition of L-arginine uptake by lung endothelial cells. *Am J Physiol* 272: L78-L84

## Abbildungen

- Abb. 1:** Strukturformel von L-Arginin; Molekulargewicht 174,20 g/mol; Summenformel  $C_6H_{15}N_4O_2$ . 6
- Abb. 2:** Biosynthese von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin (nach Nathan, 1992). 8
- Abb. 3:** Hautgewebe vor und nach der Dispasebehandlung; (a.) komplettes Hautgewebe, (b.) Epidermis, (c.) Dermis. 21
- Abb. 4:** Primärkultur von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) in EGM-MV, 3 Tage, Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads; Vergrößerung  $10 \times 20$ . 39
- Abb. 5:** Primärkultur einer gemischten Zellpopulation in EGM-MV, 5 Tage, ohne Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads; Vergrößerung  $10 \times 20$ . 40
- Abb. 6:** Konfluente Monolayer einer Primärkultur von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) in EGM-MV, 10 Tage, Separation mit anti-PECAM-1 beschichteten Dynabeads; (a.) Vergrößerung  $10 \times 10$  (b.) HDMEC mit anhaftenden Dynabeads (Pfeil), Vergrößerung  $10 \times 40$ . 40
- Abb. 7:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an einer Primärkultur von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 10 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC. 42
- Abb. 8:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an der 1. Passage von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 7 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC. 42
- Abb. 9:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an der 2. Passage von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 7 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC. 43
- Abb. 10:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an der 3. Passage von isolierten, mit Dynabeads separierten HDMEC, nach 7 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC. 43

- Abb. 11:** Flowzytometrische Analyse des von-Willebrand-Faktors (vWF) an einer Primärkultur einer Mischzellpopulation, nach 10 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: FACS-Analyse mit anti-human vWF-FITC. 44
- Abb. 12:** Mycoplasmen-freie Kultur von HDMEC, 1. Passage, nach 3 Tagen Kultivierungsdauer in EGM-MV, Darstellung der fluoreszierenden Zellkerne nach DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258. 45
- Abb. 13:** Bestimmung der DNA-Syntheseleistung in isolierten HDMEC, 7 Tage Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau; \* p < 0,05 im Vergleich zum Vortag, # im Vergleich zum 1.Tag; n = 24. 46
- Abb. 14:** Untersuchung der DNA-Syntheseleistung in kommerziell erhältlichen HDMEC, 7 Tage Kultivierungsdauer in EGM-MV; Methode: [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau; \* p < 0,05 im Vergleich zum Vortag, # im Vergleich zum 1.Tag; n = 12. 47
- Abb. 15:** Einfluß von L-Arginin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin im Medium); n = 3. 52
- Abb. 16:** HDMEC nach 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV mit (a.) 0,5 mM L-Arginin, (b.) 10 mM L-Arginin; Vergrößerung 10 × 10. 53
- Abb. 17:** HDMEC nach 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV mit 50 mM L-Arginin; Vergrößerung 10 × 10. 53
- Abb. 18:** Einfluß von Ca<sup>2+</sup>-Ionen (CaCl<sub>2</sub>) auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; n = 3. 54
- Abb. 19:** Einfluß von (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (BH<sub>4</sub>) auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; n = 3. 55
- Abb. 20:** Einfluß von L-Ornithin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; n = 3. 56

- Abb. 21:** Einfluß von L-Lysin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 57
- Abb. 22:** Einfluß von L-Arginyl-L-Arginin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 58
- Abb. 23:** Einfluß von L-Arginyl-L-Leucin auf die Proliferation von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Zellanzahlbestimmung mittels Coulter; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 59
- Abb. 24:** Konzentrationsreihe mit  $\text{NaNO}_2$  in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Griess-Reaktion nach Green et al., 1982;  $n = 6$ . 60
- Abb. 25:** Einfluß von L-Arginin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin);  $n = 3$ . 61
- Abb. 26:** Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $\text{CaCl}_2$ ) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 62
- Abb. 27:** Einfluß von (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin ( $\text{BH}_4$ ) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 63
- Abb. 28:** Einfluß von L-Ornithin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV, Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 64
- Abb. 29:** Einfluß der gleichzeitigen Behandlung mit L-Ornithin (2 mM) und L-Arginin (5 mM) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich zur L-Ornithin-behandelten Probe (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin im Medium);  $n = 3$ . 65

- Abb. 30:** Einfluß von L-Lysin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 66
- Abb. 31:** Einfluß der gleichzeitigen Behandlung mit L-Lysin (2 mM) und L-Arginin (5 mM) auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle; #  $p < 0,05$  im Vergleich zur L-Lysin-behandelten Probe (0,5 mM Basalkonzentration an L-Arginin im Medium);  $n = 3$ . 67
- Abb. 32:** Einfluß von L-Arginyl-L-Arginin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 68
- Abb. 33:** Einfluß von L-Arginyl-L-Leucin auf die NO-Freisetzung von HDMEC, nach 24, 48, 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Bestimmung des Nitritgehaltes im Kulturmedium mit der Griess-Reaktion; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle;  $n = 3$ . 69
- Abb. 34:** Proteinexpression der (a) eNOS und (b) iNOS in HDMEC, 10 mM L-Arginin, nach 24, 48 und 72 h Inkubationsdauer in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: Westernblot, Kontrolle (K) mit 0,5 mM L-Arginin Basalkonzentration im Medium; je 20  $\mu$ g Protein, Molekulargewichte: eNOS (140 kDa), iNOS (130 kDa). 70
- Abb. 35:** Einfluß von L-Arginin auf die mRNA-Expression der eNOS und iNOS in HDMEC, nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit in phenolrotfreiem EGM-MV; Methode: RT-PCR mit spezifischen Primern; Negativkontrolle: anstelle der cDNA als Template wurde DEPC-H<sub>2</sub>O in der PCR eingesetzt;  $n = 3$ . 71
- Abb. 36:** Semiquantitative Auswertung der RT-PCR-Produkte für eNOS, bezogen auf die RT-PCR-Produkte von GAPDH; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM L-Arginin Basalkonzentration im Medium);  $n = 3$ . 72
- Abb. 37:** Semiquantitative Auswertung der RT-PCR-Produkte für iNOS, bezogen auf die RT-PCR-Produkte von GAPDH; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle (0,5 mM L-Arginin Basalkonzentration im Medium);  $n = 3$ . 73

## Tabellen

- Tab. 1:** Beispiele für unterschiedlich wirksame Inhibitoren der NO-Synthasen (nach Nathan, 1992). 12
- Tab. 2:** Effizienz der Isolierungsmethode für humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen aus Vorhautgewebe (Hewett and Murray, 1993) unter Verwendung von anti-CD31-beschichteten Dynabeads. 39
- Tab. 3:** Quantitative Bestimmung des Anteils der vWF-positiven Zellen bezüglich der vermessenen Gesamtpopulation in den verschiedenen Zellkulturen; Methode: Flowzytometrische Analyse mit anti-human vWF-FITC; n = 3. 44

Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Dermatologie“ der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Wohlrab.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Wohlrab danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und für die wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Forschungstätigkeit.

Bei Herrn Dr. med. habil. Johannes Wohlrab möchte ich mich für die kooperative Zusammenarbeit und dem entgegengebrachten Engagement bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Karin Hölsken und Ursula Schramm, die mich professionell in die Zellkulturtechnik einwiesen und stets durch liebevolle Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Untersuchungen für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Klapperstück danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung flowzytometrischer Untersuchungen sowie für die kritischen Diskussionen.

Frau Dipl.-Biol. Kristin Recker danke ich ganz herzlich für freundschaftliche Zusammenarbeit, für die fruchtbare Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Allen ungenannten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Experimentelle Dermatologie“ der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie sei gedankt, die durch ihre fachliche Kompetenz und durch ihr freundschaftliches Entgegenkommen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Die Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie, die mich während der gesamten akademischen Ausbildung liebevoll unterstützt hat.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle, den 22.04.2002

Ramona Körting

Ramona Körting  
Willy-Lohmann-Strasse 12  
06114 Halle/Saale

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 30.07.1974  
Geburtsort: Schwerin  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

Schulbildung: 1981-1990 Polytechnische Oberschule in Neubrandenburg  
1990-1993 Curie-Gymnasium in Neubrandenburg

Berufsausbildung: Okt. 1993-Sep. 1995 Grundstudium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Okt. 1995-Okt. 1997 Hauptstudium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Nov. 1997-Nov. 1998 Diplomandin im Institut für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Thema: Biochemische Untersuchungen zum Stoffwechsel von Zuckern und Glykoproteinen bei Peptostreptokokken  
Dez. 1998-Apr. 2002 Anfertigung der Dissertationsarbeit in der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie in Halle/Saale  
Dez. 1998-Nov. 2001 Stipendiatin des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“  
seit Juni 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Ernährungswissenschaften der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Fremdsprachenkenntnisse: Russisch, Französisch, Latein, Englisch

## Publikationsliste

J. Wohlrab, R. Körting, W.Ch. Marsch (1999)

Induktion der NO-Synthase-Isoenzyme in HDMEC durch L-Arginin

*Dermatosen 47: S 19*

J. Wohlrab, R. Körting, W.Ch. Marsch (2000)

Induction of the NO-synthase isoenzymes in HDMEC by L-arginine

*Arch Dermatol Res 292: S 143*

R. Koerting, J. Wohlrab, W.Ch. Marsch (2001)

Permanent expression of inducible nitric oxide synthase in human dermal microvascular endothelial cells

*Arch Dermatol Res 293: S 75*

J. Wohlrab, R. Körting, P. Helmbold, W.Ch. Marsch (2001)

The NO release test as a functional reference standard for laser Doppler fluxmetry in cutaneous microangiology

*Skin Res Technol 7: S 172-175*

R. Körting, W.Ch. Marsch, J. Wohlrab (2001)

Regulation der Aktivität und der Expression von NOS-Isoenzymen in HDMEC

*Zeitschrift für Hautkrankheiten 76: S 477*