

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

Thema

**Untersuchungen zur Funktion des  $\gamma^+$ -Transporters an der  
Augenoberfläche und im Gehirn des Menschen**

Habilitationsschrift  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines habilitierten Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. rer. medic. habil.)  
für das Fachgebiet Anatomie und Zellbiologie

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

von: Dr. rer. nat. Kristin Jäger

geboren am: 20.04.1977

in: Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe

Tag der Vorlesung: 23.04.2014

Tag der Verteidigung: 13.05.2014

## Referat und bibliographische Beschreibung

Der  $\gamma^+$ -Transporter ist mit seinen repräsentierenden Proteinen, CAT1, 2 und 3, ein wichtiger Faktor für das gesunde Überleben einer Zelle bzw. eines Organismus. Da er einen Hauptanteil des Transportes der kationischen Aminosäuren, L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin, in Säugerzellen übernimmt, wird er zum limitierenden Faktor für die Ausführung einer Vielzahl von wichtigen Aufgaben in Säugerzellen und somit für den kompletten Organismus. Dies wird zum Beispiel durch den Knockout seiner repräsentierenden Proteine deutlich. Der homozygote Knockout von CAT1 ist kurz nach der Geburt letal. Bis zur Geburt kann dieser Mangel von CAT3 kompensiert werden. Nach der Geburt wird CAT3 von Rodentiziden jedoch nur noch ausschließlich im Gehirn exprimiert. Damit kommt es im Körperstamm zu einer extremen Unterversorgung der Zellen mit kationischen Aminosäuren, was mit dem Leben nicht vereinbar ist. Wird CAT2 in Makrophagen ausgeknockt, ist die Stickstoffmonoxidproduktion dieser Makrophagen nach Immunstimulation um 98% reduziert, was erhebliche Folgen für die Immunabwehr hat.

Die Aufgaben der kationischen Aminosäuren sind im tierischen und menschlichen Organismus extremst vielfältig und bei weitem noch nicht in ihrem kompletten Umfang erfasst. Die Expression und Regulation der  $\gamma^+$ -Transporter-Proteine sind ein limitierender Faktor für die Bereitstellung dieser Aminosäuren. Vor kurzem hat man begonnen zu begreifen, dass eine Fehlregulierung oder Veränderungen in der Expression der Transportproteine zu diversen Fehlfunktionen in der Zelle führen können und begann diese zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zum besseren Verständnis von Erkrankungen und Fehlfunktionen, die mit veränderter L-Argininkonzentration bzw. Veränderungen der Konzentrationen seiner Metabolite (wie z.B. Harnstoff, Agmatin) einhergehen. Dabei wird die Expression und Regulation des Transporters untersucht, aber auch die Regulation diverser Metabolite des L-Arginins, L-Lysins oder L-Ornithins bzw. derer Metabolisierungsenzyme. Dieses Verständnis könnte eine Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze verschiedener Erkrankungen bieten.

Jäger, Kristin. „Untersuchungen zur Funktion des  $\gamma^+$ -Transporters an der Augenoberfläche und im Gehirn des Menschen“. Halle, Uni., Medizinische Fakultät, Habilitation, 46 Seiten, 2013

## **INHALTSVERZEICHNIS**

---

1.	Einleitung	1
2.1	Die Augenoberfläche als Barriere zur Umwelt	5
2.1.1	Expression und Regulation des $\gamma^+$ -Transporters bei entzündlichen Erkrankungen des Auges	6
2.1.2	Die Bedeutung des $\gamma^+$ -Transporters für die $\beta$ -Defensin-Produktion	8
2.1.3	<i>In vitro</i> Nachweis der Beteiligung des $\gamma^+$ -Transporter an der $\beta$ -Defensin-Produktion	12
2.2.	Der $\gamma^+$ -Transporter im Hinblick auf das Trockene Auge und den Tränenfilm	12
2.2.1	Die Relevanz von Harnstoff im Tränenfilm	15
2.2.2	Expression Harnstoff synthetisierender Enzyme in der Augenoberfläche und Assoziation des „Trockenen Auge Syndroms“ mit einem verminderten Harnstoffgehalt im Tränenfilm	18
2.3.	Die Bedeutung von L-Arginin und seiner Metabolite im Gehirn	19
2.3.1	Agmatin im Gehirn	19
2.3.2	Die Rolle von Agmatinase bei affektiven Störungen	21
2.3.3	Stickstoffmonoxid im Gehirn	22
2.3.4	Biogene Polyamine im Gehirn	24
2.4	Transport von L-Arginin im Gehirn	27
2.4.1	Die Verteilung des $\gamma^+$ -Transporters im menschlichen Gehirn	29
3.	Zusammenfassung	30
4.	Literaturverzeichnis	32
	Anhang	47
	Lebenslauf	47
	Erklärung	49
	Danksagung	50
	Thema relevante eigene Publikationen	51

### 1. Einleitung

Der membranständige  $y^+$ -Transporter spielt eine dominierende Rolle bei der Aufnahme von L-Arginin in die Säugerzellen. Er gewährleistet etwa 60-80% des gesamten L-Arginin Transportes in die Zelle, ist selektiv, stereospezifisch und transportiert ausschließlich die L-chiralen Formen der kationischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin.

Kationische Aminosäuren, insbesondere L-Arginin und L-Ornithin, spielen eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus (Barbul et al., 1995). Die semiessentielle Aminosäure, L-Arginin ist an vielen anabolischen Prozessen, wie Wachstum (Anderson and Dobson et al., 1959), Proteinsynthese und Wundheilung (Barbul et al., 1990; Kirk et al., 1993) beteiligt. Außerdem ist L-Arginin durch die Metabolisierung zu Harnstoff und L-Ornithin für die Stickstoffbalance essentiell. Harnstoff dient in der Haut als Moisturizer und L-Ornithin als Precursor für die Synthese der proliferationsfördernden Proteine Kreatin und Polyamin (wie Spermin, Spermidin und Putrescin). L-Arginin ist außerdem ein Vorläufer des Stickstoffmonoxids (NO), das z.B. für die Regulation der kutanen Mikrozirkulation (Brovkovich et al., 1999; Figueroa et al., 2001) von Bedeutung ist. Darüber hinaus ist es an der Freisetzung von Wachstumshormonen aus der Hypophyse (Alba-Roth et al., 1988), Insulin aus dem Pankreas (Apostol and Tayek, 2003) und Noradrenalin aus der Nebenniere beteiligt. Weiterhin verbessert es die zelluläre Immunantwort, trägt zur Bildung von T-Lymphozyten bei und regt die Phagozytose an. All diese Effekte erfordern den Transport der Aminosäure in die Zelle. Zum Transport der kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin sind vier Transportsysteme ( $B_0^+$ ;  $b_0^+$ ;  $y^+L$  und  $y^+$ ) bekannt. Sie unterscheiden sich in ihrer Interaktion mit neutralen Aminosäuren und mit anorganischen Kationen. So ist für  $B_0^+$ , das auch neutrale Aminosäuren transportieren kann,  $Na^+$  erforderlich (Van Winkle et al., 1985). Der  $y^+$ -Transporter ist, wie auch  $b_0^+$  und  $y^+L$ ,  $Na^+$ -unabhängig, kann aber im Gegensatz zu  $B_0^+$  und  $b_0^+$  keine neutralen Aminosäuren transportieren (Christensen und Antonioli, 1969). Stellt man  $y^+L$  Natrium-Ionen zur Verfügung, ist auch dieses Transportsystem in der Lage, neutrale Aminosäuren zu befördern (Devés et al., 1992).  $B_0^+$ ;  $b_0^+$ ;  $y^+L$  werden als verschiedene heteromere Transportproteine der BAT-Familie zugeordnet. Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, inwiefern die Proteine der BAT-Familie Transporter sind oder nur am Transport beteiligte Proteine darstellen (Bertran et al., 1992; Closs, 2002; Devès und

Boyd, 1998).  $Y^+L$  vermittelt eher Export als Import kationischer Aminosäuren in nicht epitheliale Zellen (Closs et al., 2006). Der Hauptteil der L-Arginin-Aufnahme in Säugerzellen wird durch den äußerst selektiven  $y^+$ -Transporter gewährleistet (Bauch et al., 2003), was ihn zu einem limitierenden Faktor für die L-Arginin Verfügbarkeit in der Zelle macht. Repräsentiert wird dieser Transporter durch die CAT-Proteine (**C**ationic **A**mino acid **T**ransporter proteins), die wiederum beim Menschen durch mindestens 4 Transkripte kodiert werden (humanCAT1, 2a, 2b und 3).

Die Regulation von Transkription und Translation der Transporter Proteine ist sehr komplex und findet über viele verschiedene Initiations-, Promotorelemente und Phosphorylierungsvorgänge statt (Closs et al., 2007). Inhibierend ist z.B. die Proteinkinase  $C\alpha$ , deren Aktivierung zu einer Abnahme der Zelloberflächenexpression von CAT1 und 3 führt (Rotmann et al., 2004; 2006). Die Transportaktivität vor allem von CAT1 wird maßgeblich durch 2 Hauptkomponenten bestimmt. Erstens über Transstimulation, d.h. geringe Konzentrationen an kationischen Aminosäuren erhöhen die Transportaktivität von CAT1, und Zweitens über das Membranpotential. Der CAT1-Transport ist Spannungsabhängig, eine Hyperpolarisation erhöht den Influx und erniedrigt den Efflux der Aminosäuren (Kavanaugh 1993; Rotmann et al., 2004). CAT2 und 3 sind weniger abhängig von Transstimulation und Membranpotential. Wahrscheinlich sind sie verantwortlich für den Transport kationischer Aminosäuren in Depolarisierten und Substratentleerten Zellen (Closs et al., 2007).

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Bedeutung des  $y^+$ -Transporters für die Bereitstellung von NO in Makrophagen (Nicholson et al., 2001) und seine damit verbundene Notwendigkeit für die angeborene Immunabwehr. Das macht ihn zu einem interessanten Ziel für die Untersuchungen neuer Therapieansätze im Rahmen entzündlicher Erkrankungen verschiedenster Art (z.B. Psoriasis, Dry Eye Syndrom, Erkrankungen des zentralen Nervensystems). Die Untersuchungen beziehen sich dabei auf die Expression, Regulation oder Funktionalität (hier in Bezug auf die L-Argininmetabolite Harnstoff und Agmatin) des  $y^+$ -Transporters, dessen Veränderungen vielfältige Auswirkung auf Zellen, Organe oder Gewebe haben können und damit zu pathologischen Veränderungen führen.

Im Zentrum steht dabei die Frage nach der Bedeutung des  $y^+$ -Transporters bei verschiedenen Erkrankungen der Augenoberfläche und des Gehirns. Hierfür wurden zusätzlich Konzentrationsbestimmungen für wichtige L-Arginin-Metabolite (Harnstoff

und Agmatin) vorgenommen. Des Weiteren wurden gesundes und pathologisch verändertes humanes Gewebe sowie Körperflüssigkeiten untersucht, die spätestens 24 Stunden *post mortem* Körperspendern oder frisch von Patienten, unter Beachtung der Deklaration von Helsinki, entnommen wurden. Zur Simulation von speziellen immunologischen Ereignissen der Augenoberfläche wurden SV40-transformierte humane Kornea-Epithelzellen (HCE, Kaoru Araki-Sasaki, Tane Memorial Eye Hospital, Osaka, Japan) sowie spontan immortalisierte Konjunktiva-Epithelzellen (IOBA-NHC, Yolanda Diebold, University Institute of Applied Ophthalmobiology [IOBA], University of Valladolid, Valladolid, Spain) einschichtig konfluent kultiviert und mit Entzündungsmediatoren stimuliert. Die Zellen bzw. Gewebe wurden anschließend immunhistochemisch und molekularbiologisch analysiert und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse wurden, wie im Folgenden dargelegt, als wissenschaftliche Artikel publiziert und auf nationalen und internationalen Kongressen als Poster oder Vorträge präsentiert. Sie bilden die Grundlage dieser kumulativen Habilitationsschrift.

Die Artikel beschreiben,

- **die Expression des  $\gamma^+$ -Transporter und dessen Bedeutung für Erkrankungen und Immunsystem an der Augenoberfläche**

**Jäger K**, Boenisch U, Risch M, Worlitzsch D, Paulsen FP. (2009) Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased ocular surface. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:1112-1121

Garreis F, Schlorf T, Worlitzsch D, Steven P, Bräuer L, **Jäger K**, Paulsen F. (2010) Roles of human beta-defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells. Histochem Cell Biol. 134:59-73

**Jäger K**, Nielitz A, Garreis F, Sel S, Nave H, Paulsen FP. (2011) In vitro evidence of involvement of the epithelial  $\gamma^+$  transporter in  $\beta$ -defensin production on the ocular surface. Ann Anat. 193(6):479-485

- **den  $\gamma^+$ -Transporter und dessen Bedeutung für das Trockene Auge**

**Jäger K**, Garreis F, Posa A, Dunse M, Paulsen F. (2010) Functional relationship between cationic amino acid transporters and  $\beta$ -defensins: implications for dry skin diseases and the dry eye. *Ann Anat.* 192:65-69

**Jäger K**, Kielstein H, Dunse M, Nass N, Paulsen F, Sel S. (2013) Enzymes of urea synthesis are expressed at the ocular surface, and decreased urea in the tear fluid is associated with dry eye syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 251(8):1995-2002

- **die Lokalisation des  $\gamma^+$ -Transporters im Gehirn und dessen Bedeutung für Agmatinase bei affektiven Störungen**

**Jäger K**, Wolf S, Dobrowolny H, Steiner J, Nave H, Maronde E, Bogerts B, Bernstein HG. (2013) Differential topochemistry of three cationic amino acid transporter proteins, hCAT1, hCAT2 and hCAT3, in the adult human brain. *Amino Acids.* 44:423-433

Bernstein HG, Stich C, **Jäger K**, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G. (2012) Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology.* 62:237-246

Die vorliegende Habilitationsschrift gliedert sich in drei Abschnitte, die den L-Arginin-Transporter  $\gamma^+$  in Bezug auf Erkrankungen der Augenoberfläche (2.1), zu Harnstoff im Tränenfilm (2.2), zur Lokalisation (2.4) und Erkrankungen des Gehirns (2.3) diskutieren.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Die Augenoberfläche als Barriere zur Umwelt

Jährlich kommt es weltweit zu 55 Millionen Augenverletzungen (WHO-Programm zur Prävention von Erblindungen). Neueste Studien zeigen, dass 1/3 aller 4 Jährigen eine Sehschwäche aufweisen, von denen jedoch nur 40% erkannt werden. Teilweise ist diese Sehschwäche auf vorangegangene Infektionen der Augen zurückzuführen (Mitteilung des Bundesverbandes der Augenärzte). In den meisten Fällen sind durch die Späterkennung irreversible Folgeschäden zu erwarten. Der Ausgleich eines Sehfehlers ist zwar heutzutage möglich, so tragen etwa 30 Millionen Menschen in Deutschland Brillen- oder Kontaktlinsen und in den USA 120 Millionen Menschen. Jedoch steigt, durch das Tragen schlecht angepasster bzw. nicht hygienisch einwandfreier Linsen, das Risiko für Entzündungen der Augenoberfläche erheblich (Ky et al., 1998; Rau et al. 2008). Seit einigen Jahren werden Sehfehler zunehmend durch LASIK (laser-assisted in situ keratomileusis) behandelt. Im Jahr 2000 wurden in den USA bereits 1,55 Millionen Eingriffe verzeichnet. Die Anzahl der Laserbehandlung wächst seitdem weltweit um 10-25% jährlich. Obwohl die LASIK im Vergleich zur photorefraktiven und radikalen Keratomie als sicherer und weniger komplikationsbehaftet gilt, zeigen sich auch hier, wie bei allen Augen-Operationen, Probleme mit Sekundärinfektionen (Freitas et al. 2001; Garg P, 2001). Generell sind bakterielle Keratitiden und Konjunktividen die häufigsten Diagnosen in der augenärztlichen Praxis. Sie zeigen sich vor allem bei Patienten nach langem Tragen von Kontaktlinsen, nach refraktiver Hornhautchirurgie, nach penetrierenden Hornhautverletzungen oder unter immunsuppressiver Behandlung (Baum 1995, Gritz und Whitcher 1998, Brennan and Chantal Coles 1997, Levartovsky et al., 2001). Die pathogenen Auslöser für eine Keratitis sind hauptsächlich *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Fleisig et al. 1992; O'Callaghan et al. 1997). Die bakteriellen Stoffwechselprodukte und Toxine sowie die Entzündungsreaktionen des Wirtes führen dabei oft zu schwerwiegenden Gewebeschäden mit dauerhafter Narbenbildung, bis hin zum Sehverlust (Baum 1995).

Daher ist es wichtig, dass sich die Augenoberfläche gegen die permanenten Angriffe schützen kann. Dafür ist ein hoch funktionelles Abwehrsystem unerlässlich. Ein permanenter Tränenfluss und der Lidschlag wirken mechanisch einer Besiedlung von Keimen an der Augenoberfläche entgegen. Zusätzlich enthält der Tränenfilm eine



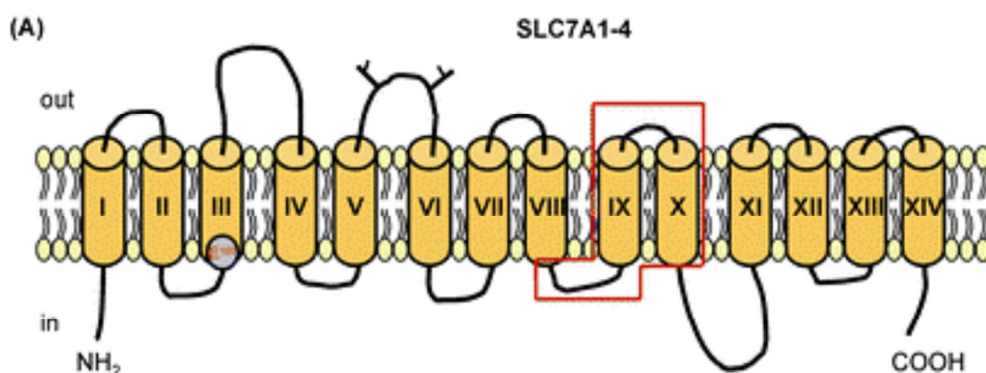
Reihe unspezifischer, antibakteriell wirksamer Substanzen wie Lysozym, Laktoferrin, sekretorische Phospholipase A2 und Faktoren des Komplementsystems und vor allem antimikrobielle Peptide. Letzteres ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems des Auges.

**Fazit: Die Augenoberfläche ist auf ein gutes Abwehrsystem angewiesen, um einen unserer wichtigsten Sinne, das Sehen, zu schützen.**

### **2.1.1 Expression und Regulation des $\gamma^+$ -Transporters bei entzündlichen Erkrankungen des Auges**

Der  $\gamma^+$ -Transporter wird durch CAT-Proteine konstituiert, die wiederum beim Menschen durch mindestens 4 Transkripte repräsentiert werden, die in den Genen CAT1, 2a, 2b und 3 kodiert sind. Als erstes Protein dieses Systems wurde 1991 SLC7A1 (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991) als Mitglied der solute carrier family 7 (SLC7) und muriner Rezeptor eines ektopen Retrovirus identifiziert (REC1). Später wurde dieser Rezeptor in mCAT-1, für Transporter kationischer Aminosäuren in der Maus umbenannt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Transporter ein integrales Membranprotein mit 14 putativen, transmembranen Domänen und intrazellulären NH<sub>2</sub>- und COOH-Termini ist (Palacin et al., 1998) (**Abb. 1**). Dieses Protein zeigte sich bei Knockout-Versuchen mit Mausmutanten essentiell für die Vitalität der Tiere, die ohne CAT1-Protein kurz nach der Geburt starben (Perkins et al., 1997). Der Vergleich der Gensequenzen von Maus und Mensch zeigte eine Übereinstimmung beider Sequenz von 86,5% (Closs et al., 1997). Als eine Besonderheit kodiert das humane Gen CAT2 (hCAT2) für zwei Splicevarianten, die aus einem primären Transkript entstehen (Hoshida et al., 1996): der niedrigaffinen Form CAT2A (Closs et al., 1993) und der hochaffinen Form CAT2B (Kakuda et al., 1993). Die einzelnen Proteine werden gewebespezifisch exprimiert und scheinen dort auch unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen. So wird CAT2A hauptsächlich in der Leber gebildet (Closs et al., 1993), CAT2B hingegen vorwiegend in Makrophagen, in denen es den für die Aufrechterhaltung der NO-Produktion erforderlichen Arginintransport unterhält (Kakuda et al., 1999; Nicholson et al., 2001). Zunächst ausschließlich in Nagetieren (Rodentia) beschrieben (Ito et al., 1997; Hosokawa et

al., 1997; Hosokawa et al., 1999), konnte hCAT3 erst 2001 identifiziert werden. In der Maus und in der Ratte wird CAT3 ausschließlich Neuronen-spezifisch exprimiert (Hosokawa et al.; 1999); beim Menschen ist eine Expression in verschiedenen Geweben, hauptsächlich im Thymus, aber auch in Burkitt Lymphomzellen, im Uterus, im Hoden, in der Mamma, im Gehirn, im Ovar und im Magen nachweisbar (Vekony et al., 2001). Es gibt noch zwei weitere Transporter, die dem  $\gamma^+$ -Transportersystem zugerechnet werden, CAT4 und 14 (Sperandeo et al., 1998; Hammermann et al., 2001; Closs et al., 2007). Ihre Funktionen sind allerdings unbekannt (Wolf et al., 2002).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Verankerung der  $\gamma^+$ -Transporter-Proteine in der Membran.

An der Augenoberfläche wurden die einzelnen Proteine des Transporter erstmals 2009 untersucht (Jäger et al., 2009). Dabei zeigte sich, dass nur hCAT1 und 2 in den untersuchten gesunden Geweben (Kornea, Konjunktiva, Tränennasengang, SV40-transformierten humane Korneaepithel- (HCE)-Zelllinie und spontan immortalisierte Konjunktivaepithel (IOBA-NHC)-Zelllinie) exprimiert werden. hCAT3 zeigte keine konstitutive Expression. hCAT2 wurde zusätzlich in der Tränendrüse identifiziert (Jäger et al., 2009).

In pathologisch oder entzündlich verändertem Gewebe (Fuchs Dystrophie, Herpes Keratitis, bullöse Keratopathie, korneale Ulzeration bei *Staphylococcus aureus* Infektion, Keratokonus), zeigte insbesondere hCAT2 einen starken Expressionsanstieg im kornealen Epithel und zum Teil auch kornealen Endothel.

Expressionstudien in Konjunktivaepithelzellen konnten dies bestätigen. Nach Stimulation mit Überständen von hitzeinaktivierten *S. aureus* oder mit TNF $\alpha$  gibt es

einen signifikanten hCAT1- und 2 Anstieg auf transkriptioneller Ebene, hCAT2-mRNA wird zusätzlich noch durch hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* Überstand stimuliert (Jäger et al., 2009).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des  $\gamma^+$ -Transporter in der Immunabwehr der Augenoberfläche. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass CAT2 essentiell für die Bereitstellung von L-Arginine in Makrophagen zur NO-Produktion ist (Kakuda et al., 1999; Nicholson et al., 2001). Eine genetische Inaktivierung (Knockout) dieses Transporters reduzierte die NO-Produktion in Makrophagen um 98% (Nicholson et al., 2001). NO ist als Komponente des angeborenen Immunsystems bezüglich seiner Antibakteriellen und Antitumoralen Wirkung gut charakterisiert (Förstermann et al., 1994; Stuehr et al., 1991; Yeramian et al., 2006; Nicholson et al., 2001).

**Fazit: Der  $\gamma^+$ -Transporter ist ein limitierender Faktor bei der Bereitstellung von L-Arginin für die Stickstoffmonoxidherstellung. Dies macht ihn zu einer wichtigen Komponente für das angeborene Immunsystem.**

### **2.1.2 Die Bedeutung des $\gamma^+$ -Transporters für die $\beta$ -Defensin-Produktion**

Eine weitere Komponente des angeborenen Immunsystem, zu deren Herstellung große Menge der Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin nötig sind, wurde bislang nicht im Zusammenhang mit dem  $\gamma^+$ -Transporter gesehen. Hierbei handelt es sich um die Gruppe der Defensine.

Defensine sind niedermolekulare, kationische Oligopeptide, die über ihre Interaktion mit Biomembranen die Lyse eines breiten Spektrums mikrobieller Zellen herbeiführen (Yang et al., 2002). Zudem besitzen Defensine ein Wirkungsspektrum gegen Pilze, grampositive und gramnegative Bakterien, sowie gegenüber einigen membrangebundenen Viren (Ganz und Weiss, 1997). Darüber hinaus fungieren sie als Entzündungsmediatoren, induzieren Angiogenese, fördern die Wundheilung und haben chemotaktische Eigenschaften (McDermott, 2004; Patrzykat and Douglas; 2005; Beisswenger and Bals, 2005; McDermott, 2009). Die chemotaktischen Eigenschaften machen sie zu einem Bindeglied zum adaptiven Immunsystem (**Abb. 2**) (Oppenheim et al., 2003). So konnten chemotaktische Beziehungen zwischen

dem humanen beta-Defensin-2 (hBD-2/DEFB2) und unreifen dendritischen Zellen, T-Gedächtniszellen und CD8+-T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Yang et al., 1999). Für das humane beta-Defensin-3 (hBD-3/DEFB3) wurden stimulierende Effekte auf Monozyten gezeigt (Garcia et al., 2001). Zusätzlich wurden Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen als Expressionsorte der humanen beta-Defensine-1 und -2 identifiziert (Duits et al., 2002).

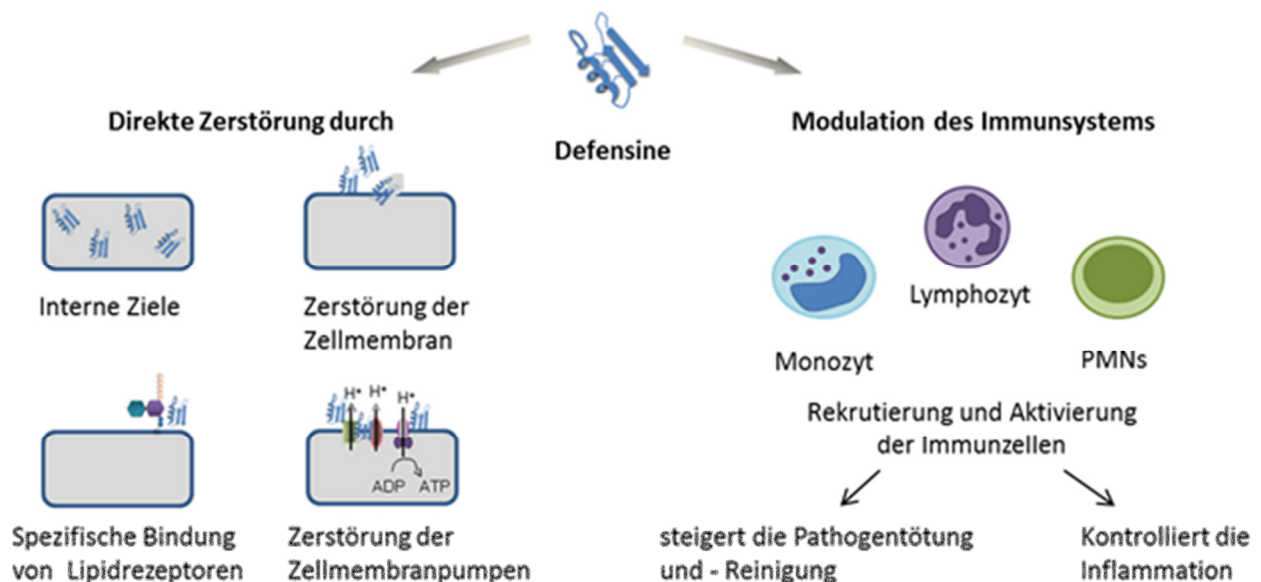
Man unterscheidet zwei Subfamilien von Defensinen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine (Schröder, 1999). Sie differieren in der intramolekularen Anordnung ihrer Disulfidbrücken (Ganz, 2003).  $\alpha$ -Defensine werden vor allem in neutrophilen Granulozyten synthetisiert (Ganz, 2003);  $\beta$ -Defensine können von Epithelien gebildet werden (Lehrer, 2004) und wurden auch an der Augenoberfläche identifiziert (McDermott, 2009, Garreis et al., 2009). Bislang konnten mehr als 20 humane  $\beta$ -Defensine (hBD) isoliert werden (Harder et al., 2001 und 1997; Krisanaprakornkit et al., 2000; Lehrer et al., 1999; Nicolas et al., 1995; Schröder, 1999b, Yamaguchi et al., 2002, Rodríguez-Jiménez et al., 2003), wovon aber bislang nur 4 näher untersucht wurden, hBD1-4 (Motzkus et al., 2006).

HBD-1 ist ein aus 36 Aminosäuren aufgebautes, basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 3,9 kDa (Schröder et al., 1999). Es wird konstitutiv in Epithelgeweben exprimiert (Harder et al., 1997; Krisanaprakornkit et al., 1998). Auch Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen exprimieren hBD-1. Neueste Studien zeigen, dass hBD-1 gegen Milchsäurebakterien und bestimmte Hefepilze nur unter sauerstoffarmen Bedingungen seine starke antibiotische Wirksamkeit entfalten kann (Schröder et al., 2011).

HBD-2 und -3 wurden erstmals von Harder und Mitarbeitern aus der menschlichen Haut von Psoriasis-Patienten isoliert (Harder et al., 1997; Harder et al., 2001). Im Vergleich zu der stark konstitutiven Expression von hBD-1, zeigen hBD-2 und 3 in gesundem Gewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates eine niedrige Expressionsrate (Garreis et al., 2009). Kommt es jedoch zum Kontakt der Epithelzellen mit grampositiven oder gramnegativen Bakterien, Pilzen und proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) steigt ihre Expression signifikant an (Dale et al., 2005; Lehrer, 2004; Sørensen et al., 2005; Garreis et al., 2009). Die Expression von hBD-3 kann zusätzlich noch durch Wachstumsfaktoren, wie Epithelial growth factor-1 (EGF-1),

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) oder Transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) (Schröder und Harder, 2006; Sørensen et al., 2005) gesteigert werden.

Beide Defensine zeigen unterschiedliche Wirkspezifitäten (Schröder und Harder, 2006; Harder et al., 1997). HBD-2 besitzt eher eine antimikrobielle Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli*, sowie gegenüber kariogenen Mikroorganismen wie *Streptococcus mutans* oder *Streptococcus sobrinus* (Nishimura et al., 2004; Shiba et al., 2003). HBD-3 hingegen zeigt eine deutlich stärkere Wirkung gegen gramnegative Bakterien (Harder et al., 2001) und besitzt im Allgemeinen auch ein breiteres Wirkspektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und Pilzen (Harder et al., 2001; Maisetta et al., 2005) als hBD-1 und -2.



**Abbildung 2:** Wirkung der Defensine. Modifiziert nach Ulm et al., 2012.

Die antimikrobielle Wirkung der Defensine beruht auf der Eigenschaft, Aggregate innerhalb der Bakterienmembran zu bilden. Die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremd (Mikroorganismen) ist durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellmembranen von Mensch und Mikroorganismus möglich. Im Gegensatz zu den Zellen des Menschen besitzt die Zellmembran von Mikroorganismen einen geringeren Anteil an Cholesterin und gleichzeitig einen hohen Anteil an negativ geladenen Phospholipiden (Yang et al., 2002). Die positiv geladenen, kationischen Aminosäurereste der Peptidkette gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit den

negativ geladenen Phospholipiden der Bakterienmembran ein. Anschließend treten hydrophobe Kräfte zwischen Kohlenwasserstoffketten der bakteriellen Phospholipide und apolaren Aminosäureresten der Defensine in Wechselwirkung. Dieser Mechanismus kann schließlich zur Einlagerung von Defensinoligomeren in die Plasmamembran führen (Hill et al., 1991). Auf Grund der ringförmigen Anordnung der Oligomere kommt es dann zur Ausbildung eines Kanals innerhalb der bakteriellen Membran. Der Verlust der Membranintegrität führt schließlich zum osmotischen Zelltod des Bakteriums (Ganz, 2003; Garcia et al., 2001; Schneider et al., 2005). Allerdings sind die Abtötungsmechanismen der Defensine noch nicht abschließend geklärt.

Vorstellbar ist auch eine Anheftung und Abdeckung der Defensine in der Art eines Teppichs („carpet-like“). Durch diese Form der Ausbreitung werden die negativen Ladungen der Phospholipide in der Zellmembran neutralisiert, was wiederum zur Beeinflussung des Membranpotentials führen könnte (Fujii et al., 1993; Hoover et al., 2000).

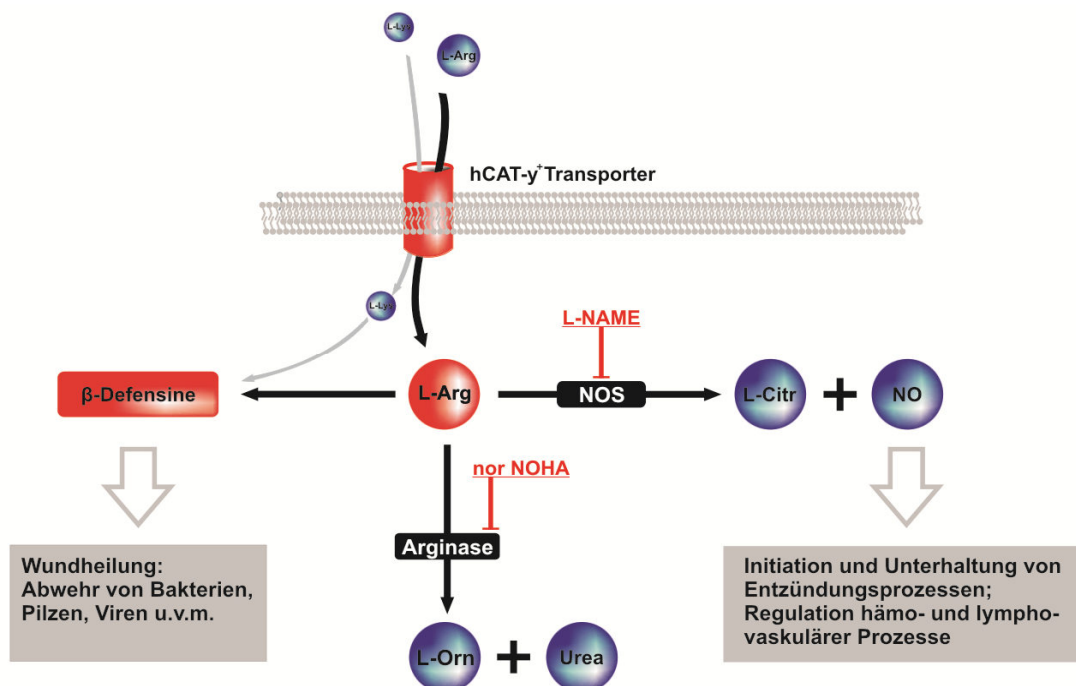
**Fazit: Die Bindung bzw. Interaktion mit mikrobiellen Membranen ist nur durch die starke positive Nettoladung der Defensine möglich. Diese kommt durch einen sehr hohen Anteil an den kationischen Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin in den Defensine zustande, wodurch der  $\gamma^+$ -Transporter zu einen limitierenden Faktor für die Synthese von  $\beta$ -Defensinen werden könnte.**

### 2.1.3 *In vitro* Nachweis der Beteiligung des $\gamma^+$ -Transporter an der $\beta$ -Defensin-Produktion

Dieses Kapitel wurde beschrieben und publiziert im Manuskript:

**Jäger K**, Nielitz A, Garreis F, Sel S, Nave H, Paulsen FP. (2011) In vitro evidence of involvement of the epithelial  $\gamma^+$ -transporter in  $\beta$ -defensin production on the ocular surface. *Ann Anat.* 193(6):479-485

Das Manuskript beschreibt, dass nicht nur Arginase und Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) um L-Arginin als Substrat konkurrieren und gegenseitig ihre Expression und Aktivität beeinflussen, sondern beide Enzyme modulieren auch die Synthese und Sekretion von hBD2 und -3 (**Abb. 3**). Dies eröffnet neue Ansatzpunkte zur Erforschung der Expressionssteigerung von hBD-2 und -3 und somit mögliche neue Therapieansätze bei entzündlichen Erkrankungen, die durch Mikroorganismen ausgelöst werden.



**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt drei mögliche Stoffwechselwege von L-Arginin, welches durch den  $\gamma^+$ -Transporter in die Zelle eingeschleust wurde. Sie soll die potentielle Konkurrenz um diese kationische Aminosäure verdeutlichen. L-Arginin kann unter anderem in der Zelle durch Arginase und NOS verstoffwechselt werden oder zur Produktion von  $\beta$ -Defensinen eingesetzt werden.

### 2.2. Der $\gamma$ -Transporter im Hinblick auf das Trockene Auge und den Tränenfilm

Jeder dritte Patient, der heute zum Augenarzt geht, stellt sich aufgrund eines trockenen Auges vor. Als Ursachen kommen zwei Möglichkeiten in Betracht.

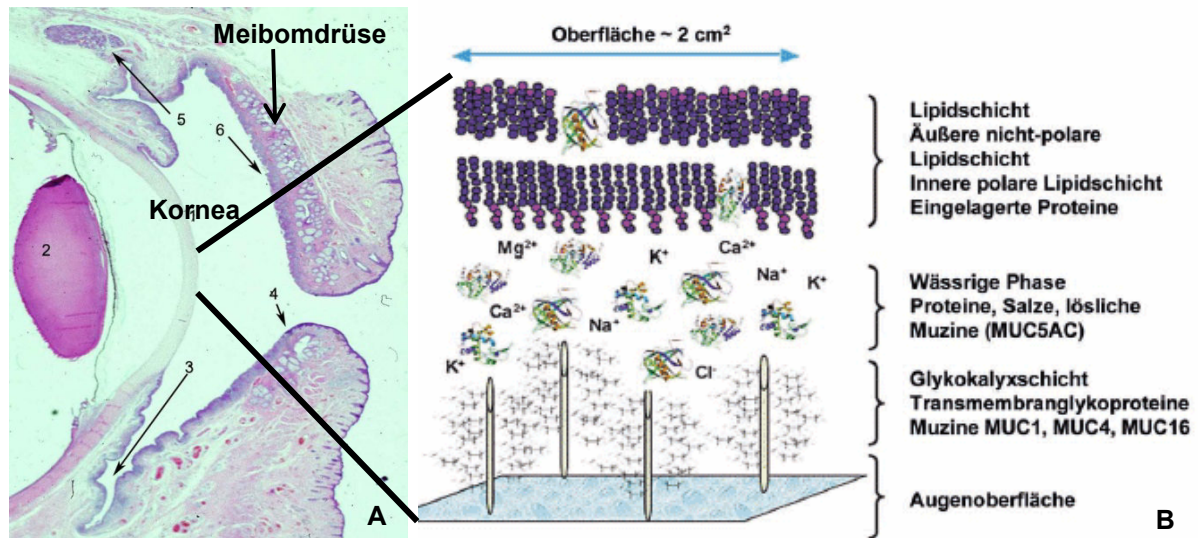
1.) eine veränderte Zusammensetzung der Lipidschicht des Tränenfilms, was mit einer erhöhten Verdunstung der wässrigen Komponente des Tränenfilms einhergeht (evaporative eye) und etwa 80% der Fälle des trockenen Auges ausmacht. Die Lipidschicht wird von den Meibomdrüsen produziert, von denen jeweils 25-40 im Ober- und Unterlid sitzen (**Abb. 4A**). Nur im richtigen Mischungsverhältnis sind die stark öligen Bestandteile des Meibomsekrets bei 19,5°C bis 40°C flüssig (Tiffany, 1986). Das Sekret besteht zu 60-70% aus Cholesterol, Wachs- und Cholesterylestern (Butovich et al., 2008). Bis vor kurzem zählten auch Phospholipide zu den wichtigen Bestandteilen des Meibomsekrets. Sie sollten als stabile Zwischenschicht die Basis der Verbindung zwischen Lipidschicht und wässriger Phase bilden (McCulley et al., 1997). Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass Phospholipide eine eher unbedeutende Rolle im Meibomsekret spielen (Butovich et al., 2008, Green-Church et al., 2011), so dass man momentan nach neuen Kandidaten sucht, die diese Interaktion vermitteln können (**Abb. 4B**). Eine Störung in der Zusammensetzung dieser Zwischenschicht könnte somit zur Instabilität führen, was das Aufreißen des Tränenfilms zur Folge hätte.

2.) basiert ein wesentlich geringer Anteil (ca. 20%) der Fälle des Trockenen Auges auf einer verminderten Aktivität oder Störung der Glandula lacrimalis (Tränendrüse), welche den größten Teil der wässrigen Komponente des Tränenfilms produziert. Diese Störung führt zu einem Flüssigkeitsmangel (aqueous tear deficiency). In der wässrigen Komponente (98 % Wasser) sind antimikrobielle und fungizide Substanzen, sowie Nährstoffe enthalten. Eine Verminderung oder sogar ein Verlust der wässrigen Komponente setzt die Immunabwehr des Auges herab und geht mit Konjunktividen und Keratitiden einher. Außerdem kann eine Mangelernährung der Kornea resultieren, die in ausgeprägten Fällen zum Transparenzverlust der Hornhaut und somit zur Erblindung führt.

In den meisten Fällen besteht nur die Möglichkeit einer symptomatischen Behandlung durch Tränenersatzmittel oder liposomale Augensprays, die mehrmals



täglich eingesetzt werden müssen und nur eine Linderung der Beschwerden bewirken ohne die Ursache der Erkrankung anzugehen.



**Abbildung 4:** Abbildung 4A zeigt einen Querschnitt durch das vordere Auge. Zu erkennen sind die Kornea und die in das Ober- und Unterlid eingebetteten Meibomdrüsen. Abbildung 4B zeigt das aktuell vorgeschlagene Modell des präkornealen Tränenfilms, welches die Beziehung und Interaktion der Lipidbindenden Proteine und der äußeren Lipidschicht zeigt (Nichols et al., 2011).

Auffällig ist, dass besonders Erkrankungen, die mit einem L-Arginin-Mangel (Psoriasis, Diabetes; akutes Nierenversagen; Schramm et al., 2002) oder einer veränderten Harnstoffkonzentration einhergehen (chronisches Nierenversagen), signifikant häufig mit einem trockenen Auge assoziiert sind (Karabulut et al., 1999; Akinci et al., 2007; Akinci et al., 2009). Man könnte einen iatrogenen Effekt vermuten, der allerdings in diesem Zusammenhang eher unwahrscheinlich erscheint. So sind zwar verschiedene Medikamente als Auslöser eines trockenen Auges bekannt, wie Betablocker (Siepmann et al., 1994), Anticholinergika, Antihistaminika und Psychopharmaka (Wong et al., 2011). Doch auch verschiedene Tierversuche zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen z.B. Diabetes und dem Trockenen Auge (Humphreys-Beher, 1996; Williams et al., 2007). Da in diesen Tierversuchen keine Medikamente eingesetzt wurden, kann man hier diese als Auslöser für das Trockene Auge ausschließen. In diesem Zusammenhang erscheint eine Betrachtung des L-Arginin-Mangels interessant.

L-Arginin wird, wie im vorherigen Kapitel (2.1.1) besprochen, hauptsächlich durch den  $\gamma^+$ -Transporter in die Zellen transportiert. Dort kann die semiessentielle

Aminosäure unter anderem zu NO, L-Ornithin und Harnstoff verstoffwechselt werden oder zusammen mit L-Lysin für die Produktion von  $\beta$ -Defensinen genutzt werden (**Abb. 3**). NO und  $\beta$ -Defensine dienen der Immunabwehr. L-Ornithin ist z.B. für Zellerneuerung und Wundheilung von Bedeutung. Harnstoff ist jedoch bislang weitgehend als Stoffwechselendprodukt bekannt. Nur in der Dermatologie kennt man Harnstoff als Moisturizer und nutzt ihn in verschiedenen Formulierungen zur Erhöhung der Wasserbindungskapazität der Haut.

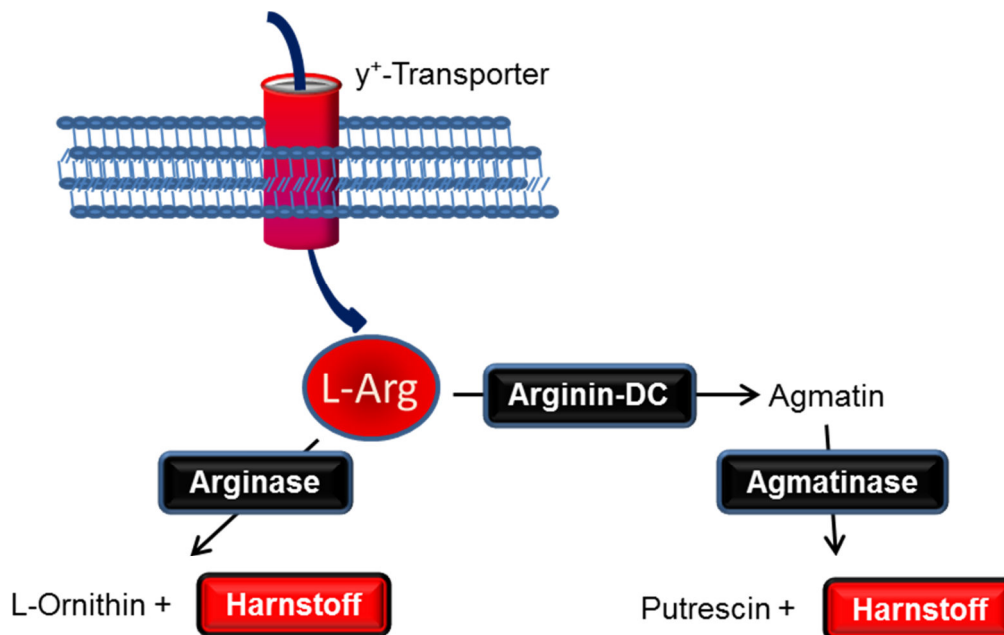
Der Transport der kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin in die Zellen der Augenoberfläche ist demnach wichtig für die Immunabwehr und Ernährung des Auges. An der Augenoberfläche kann der Transport durch die Expression des  $\gamma^+$ -Transporters gewährleistet werden. Die Expression der hCAT-Proteine und mRNA des  $\gamma^+$ -Transporters wurden 2009 in Kornea, Tränendrüse und Konjunktiva nachgewiesen (Jäger et al., 2009). Zwar konnten in der Kornea von Mensch und Kaninchen auch die mRNAs der Aminosäure Transporter B (0, +) und LAT identifiziert werden (Jain-Vakkalagadda et al., 2004) sie scheinen allerdings für die Immunabwehr und den Aufbau des Tränenfilms keine wesentliche Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu kommt dem  $\gamma^+$ -Transporter durch die Proteine hCAT1 und 2 eine Bedeutung für die Immunabwehr des Auges zu (Jäger et al., 2011; Jäger et al., 2009). Eine weitere wichtige Aufgabe des  $\gamma^+$ -Transporters der Augenoberfläche könnte die Bereitstellung von L-Arginin für die Metabolisierung zu Harnstoff im Tränenfilm sein. Harnstoff wird als physiologische Komponente des Tränenfilms diskutiert und könnte hier eine ähnliche Aufgabe wie in der Haut erfüllen.

**Fazit: Erkrankungen die mit einem L-Arginin-Mangel einhergehen sind signifikant häufiger mit einem Trockenen Auge assoziiert. Der L-Arginin-Mangel spricht für eine Konkurrenz um die semiessentielle Aminosäure.**

### **2.2.1 Die Relevanz von Harnstoff im Tränenfilm**

Harnstoff entsteht im Stoffwechsel als Hauptendprodukt des Protein- und Aminosäureabbaus. Dabei nimmt die semiessentielle Aminosäure L-Arginin eine zentrale Rolle ein. Sie kann über zwei verschiedene Stoffwechselwege zu Harnstoff metabolisiert werden. Zum einen wird Arginin durch Arginase zu Harnstoff und L-Ornithin (Jenkins et al., 1994) und zum anderen über Arginindecarboxylase zu

Agmatin und dieses über Agmatinase zu Putrescin und Harnstoff verstoffwechselt (Morris, 2004; Iyer et al., 2002; Mistry et al., 2002) (**Abb. 5**).



**Abbildung 5:** Metabolisierungswege von L-Arginin zu Harnstoff.

Als organische Verbindung wird Harnstoff nach derzeitigem Stand der Literatur vom Mensch als ein Endprodukt des Stoffwechsels von Stickstoffverbindungen im Harnstoffzyklus produziert und zu 90 Prozent über die Nieren ausgeschieden, der Rest mit Schweiß und Darmsekreten. In der Dermatologie ist Harnstoff nicht nur als Stoffwechselendprodukt bekannt, sondern erlangte hier große Bedeutung als Moisturizer. Harnstoff wird in der Haut, vor allem während des Verhornungsprozesses der Keratinozyten, beim Abbau spezifischer Aminosäuren, insbesondere Arginin, gebildet. Bei Verhornungsstörungen (wie z.B. Psoriasis, Neurodermitis) kommt es zu einem Mangel an Arginin in der Haut. Dies führt zu einer deutlichen Abnahme der Harnstoff-Konzentration, wodurch die natürliche Feuchthaltefunktion reduziert wird. Bei Vergleichsmessungen fand man in klinisch trockener Haut eine um 50% niedrigere Harnstoff-Konzentration als in gesunder Haut (Wellner et al., 1992). Durch diesen Mangel an natürlichen Moisturizer kommt es zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL). Die Haut wird spröde und es entstehen offene Läsionen in der Hautoberfläche. Harnstoff führt durch seine Wasserbindung zu einem hydrophilen Kompartiment in der Haut, das in der interzellulären Lipidmatrix

für die Organisation der bipolaren Lipide und damit für die Membranformation sorgt (Jessberger, 1988) und somit dem transepidermalen Wasserverlust entgegenwirkt.

Auch das Vorkommen von Harnstoff im Tränenfilm ist bereits seit längerem bekannt (Ridley et al., 1930). Allerdings wurde diesem Befund bislang keine Bedeutung beigemessen. Harnstoff könnte im Tränenfilm eine ähnliche Funktion wie in der Haut erfüllen. Er könnte als Komponente der apolaren Zwischenschicht fungieren, die die Basis der Verbindung zwischen Lipidschicht und wässriger Phase bildet. Eine Veränderung der okulären Harnstoffkonzentration könnte somit zur Instabilität der Zwischenschicht führen und zum Aufreißen des Tränenfilms.

Harnstoff selbst besitzt keine Oberflächenaktivität, kann diese aber durch Bindung an oberflächenaktive Proteine beeinflussen. Bei einer zu starken Erhöhung des Harnstoffgehaltes im Tränenfilm, wie z.B. bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Farkas et al., 2003), könnte die Bindung von Harnstoff an oberflächenaktive Proteine zu einer Herabsetzung ihrer Oberflächenaktivität führen. Indem Harnstoff über seinen konformationsändernden Charakter (Caballero-Herrera et al., 2005) die räumliche Struktur der oberflächenaktiven Proteine so verändert, dass sie ihre Eigenschaft zur Herabsetzung der Oberflächenspannung verlieren und der Tränenfilm aufzureißen beginnt. Eine erniedrigte Harnstoffkonzentration könnte wiederum zu einer Deorganisation Lipidschicht des Tränenfilms führen, die Oberflächenspannung würde nicht mehr ausreichen, der Tränenfilm beginnt aufzureißen.

Da sowohl Erkrankungen mit hoher Harnstoffkonzentration in Blut und Tränenflüssigkeit, wie chronische Niereninsuffizienz (Farkas et al., 2003), als auch Erkrankungen mit verminderter Harnstoffkonzentration, wie Psoriasis (Akinci et al. 2007; Akinci et al., 2009; Zengin et al., 1996), mit einem Trockenen Auge vergesellschaftet sind, ist davon auszugehen, dass die physiologische Harnstoffkonzentration des Tränenfilms in einem eng abgestimmten Grenzen gehalten wird. Um eine definierte Menge an Harnstoff halten zu können, müsste dieser permanent und konstitutiv durch die entsprechenden Enzymen (Arginase 1 und 2, Agmatinase) gebildet werden. Bislang wurde lediglich die Anwesenheit der Proteine Arginase 1 und 2 in menschlicher Tränenflüssigkeit konstitutiv nachgewiesen (Farkas et al., 2003). Unbekannt ist, welche Zellen die Enzyme produzieren und sekretieren werden. Der Nachweis von Harnstoff als physiologische Komponente des Tränenfilms, könnte einen neuen therapeutischen Ansatz für die

Verbesserung der Symptomatik beim Trockenen Auge schaffen. Harnstoff bzw. L-Arginin wäre somit als Therapeutika in Tränenersatzflüssigkeit denkbar.

**Fazit: Die hohe Korrelation des Trockenem Auges mit Erkrankungen, deren Symptomatik mit veränderter L-Arginin bzw. Harnstoffkonzentration in Körperflüssigkeiten einhergehen, rückt Harnstoff als physiologische Komponente im Tränenfilm, wie schon in der Haut beschrieben, in den Fokus.**

### **2.2.2 Expression Harnstoff synthetisierender Enzyme in der Augenoberfläche und Assoziation des „Trockenen Auge Syndroms“ mit einem verminderten Harnstoffgehalt im Tränenfilm**

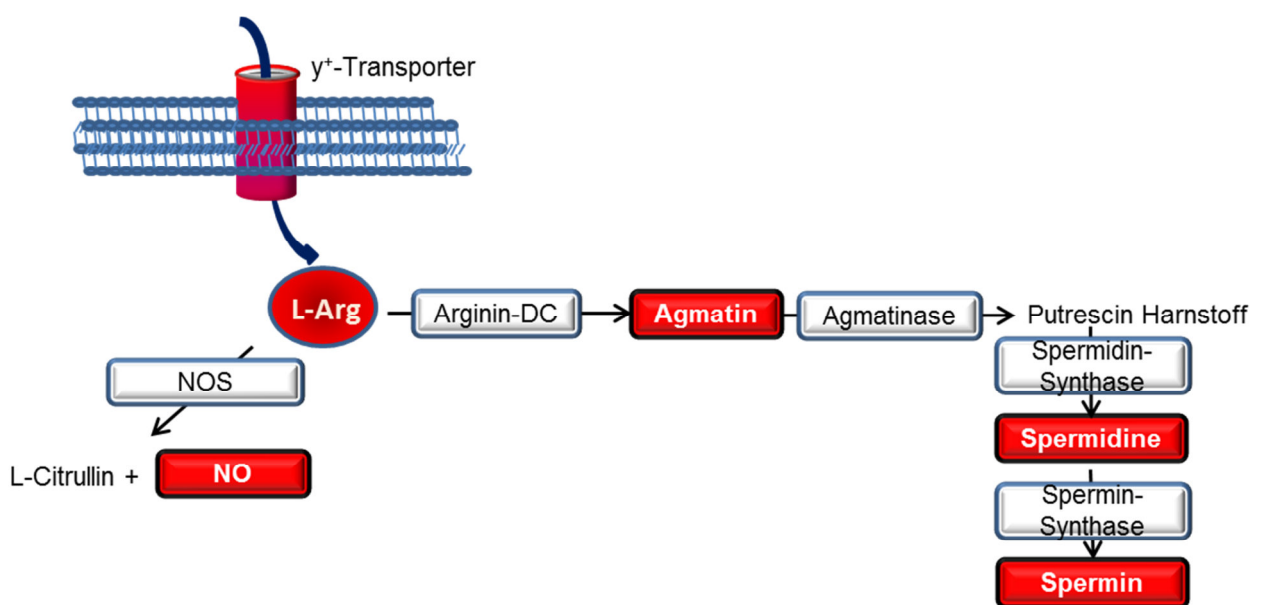
Dieses Kapitel wurde beschrieben und publiziert im Manuskript:

**Jäger K, Kielstein H, Dunse M, Nass N, Paulsen F, Sel S. (2013)** Enzymes of urea synthesis are expressed at the ocular surface and decreased urea in the tear fluid is associated with dry eye syndrome. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 251(8):1995-2002

In diesem Manuskript wurde erstmals die Expression der Harnstoffsynthetisierenden Enzyme, Arginase 1 und 2, sowie Agmatinase in Tränenrüse, Kornea und Konjunktiva beschrieben. Untersuchungen zur Harnstoff-Konzentration in Tränenflüssigkeit, Kammerwasser und Blut verschiedener Patienten, zeigten keine Korrelation zwischen der Tränenflüssigkeit und den anderen Körperflüssigkeiten. Eine Korrelation besteht aber zwischen Blut und Kammerwasser, was eine externe Zufuhr von Harnstoff in den Tränenfilm über Blut nahezu ausschließen lässt. Die Analyse von 70 Tränenproben (Gesunde und Patienten mit Trockenen Auge ohne Stoffwechselerkrankungen) zeigte eine um etwa die Hälfte reduzierte Harnstoffkonzentration im Tränenfilm von Patienten mit Trockenen Auge im Vergleich zu Gesunden. Diese Ergebnisse rücken Harnstoff und damit auch L-Arginin als mögliche Therapeutika für das Trockene Auge in den Mittelpunkt.

### 2.3. Die Bedeutung von L-Arginin und seiner Metabolite im Gehirn

L-Arginin spielt im menschlichen Körper in vielen Lebens- und überlebenswichtigen Prozessen, wie Wundheilung, Proteinsynthese, Proliferation und Immunmodulation eine zentrale Rolle. Im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) kommen für die semiessentielle Aminosäure noch weitere Aufgaben hinzu. Die dabei aus neuronaler Sicht interessanten Substanzen sind Agmatin, NO und die Polyamine Spermin und Spermidin, welche alle direkt aus L-Arginin gebildet werden können (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Metabolisierung von L-Arginin in Stickstoffmonooxid (NO) und die Polyamine Spermidin und Spermin über den Neurotransmitter Agmatin.

#### 2.3.1 Agmatin im Gehirn

Agmatin ist ein Arginin-Abbauprodukt, von dem man lange glaubte, dass es ausschließlich in Bakterien, Pflanzen und Invertebraten gebildet wird (Tabor and Tabor, 1984). Erst 1994 wurde Agmatin und das zu seiner Biosynthese notwendige Enzym Arginin-Decarboxylase in Säugetieren entdeckt (Li et al., 1994). Dabei scheint die Wirkung von Agmatin in einigen Organen, wie z.B. Leber, Magen und Gefäßen (Haulica et al., 1999; Ishizuka et al., 2000; Nguyen et al., 2003; Nissim et al., 2002) indirekter Art und rezeptorunabhängig zu sein. So wirkt Agmatin z.B. nicht direkt

antiproliferativ, sondern indirekt über die Induktion des Antizyms, das dann sowohl die Synthese als auch den Transport von Polyaminen hemmt (Dudkowska et al., 2003; Satriano et al., 1998). Auch die antiinflammatorische Wirkung von Agmatin beruht auf der Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch Agmatinaldehyd (Auguet et al., 1995; Regunathan and Piletz, 2003; Feng et al., 2002; Satriano et al., 2001). Im ZNS scheint Agmatin im Gegensatz dazu direkt zu wirken. Hier bindet es mit hoher Affinität an  $\alpha$ 2-adrenerge und Imidazolin-Rezeptoren (Reis and Regunathan, 1998). Außerdem ist es in der Lage Liganden gesteuerte Kationenkanäle, insbesondere der NMDA-Klasse, zu blockieren (Reis and Regunathan, 1998). Da Agmatin viele verschiedene molekulare Ziele und Wege besitzt (meist als Antagonist), ist es schwer seine genaue Rolle im Gesamtorganismus zu definieren (Regunathan, 2006). Die physiologische Funktion von Agmatin ist daher bislang weitgehend unbekannt (Uzbay, 2012). Einige Studien belegen, dass endogenes Agmatin als putativer Neurotransmitter in Betracht kommt (Reis und Regunathan, 2000; Bernstein et al., 2011) und direkt in Lern- und Gedächtnisprozesse involviert ist (Liu et al., 2008, 2009; Leitch et al., 2011; Seo et al., 2011). Exogen verabreichtem Agmatin soll eine Schlüsselrolle als Neurotransmitter im Rahmen verschiedener neurobiologischer Ereignissen zukommen. Damit spielt es in der Pathologie vieler verschiedener Erkrankungen des ZNS eine wichtige Rolle (Bernstein et al., 2012). Agmatin erlangt dadurch außerdem eine Relevanz als potenzielles Therapeutikum bei neurologischen Störungen (Uzbay, 2012). *In vitro* und *in vivo* Tierstudien belegen die neuroprotektive Wirkung von exogenem Agmatin bei neurotoxischen und ischämischen Hirnverletzungen (Gilad et al., 1996; Zhu et al., 2006). Ferner sind die antinozizeptiven (Paszcuk et al., 2007), anxiolytischen (Aricioglu and Altunbas, 2003; Lavinsky et al., 2003) und antidepressiven (Zomkowski et al., 2002, 2004; Aricioglu and Altunbas, 2003) Eigenschaften von Agmatin gut untersucht. Außerdem reduziert Agmatin die Inzidenz und Intensität von audiogenen epileptischen Anfällen (Uzbay et al., 2000) und die Symptome bei Entzugerscheinung nach Drogenmissbrauch (Opiate, Alkohol, Nikotin, Koffein, Cannabis: Wang et al., 2011; Zaniewska et al., 2008; Uzbay et al., 2010, Ozden et al., 2011). Eine 2010 erschienene Studie unterstützt die Hypothese, dass Agmatin eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Schizophrenie zukommt (Uzbay et al., 2010).

**Fazit: Agmatin, ein L-Arginin-Metabolit, ist ein putativer Neurotransmitter, dessen physiologische Rolle noch weitgehend unklar ist. Wichtig ist seine Rolle als Inhibitor der NOS, sowie der Polyaminsynthese und des Polyamin-transportes. Untersucht ist vor allem seine Rolle im Rahmen verschiedener Erkrankungen im ZNS.**

### **2.3.2 Die Rolle von Agmatinase bei affektiven Störungen**

Dieses Kapitel wurde beschrieben und publiziert im Manuskript:

Bernstein HG, Stich C, **Jäger K**, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G. (2012) Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology*. 62(1):237-246

Das Manuskript beschreibt die Relevanz des Agmatin-abbauenden Enzyms Agmatinase in der Pathologie affektiver Störungen beim Menschen. Gestützt wurde diese Untersuchung unter anderem durch die chromosomale Lokalisation der menschlichen Agmatinase auf Chromosom 1p36, einem Genlocus, der mit Bipolaren Störungen und Depressionen assoziiert ist (McGuffin et al., 2005; Schuhmacher et al., 2005). In der Untersuchung wurden die Hippocampi von 11 verstorbenen Patienten mit bipolaren und unipolaren Störungen mittels Immunhistochemie und Morphometrie aufgearbeitet. Der Vergleich der Gewebeproben kranker gegen „gesunde“ Kontrollen ergab eine signifikante Steigerung in Anzahl und Stärke von Agmatinase-immunpositiven Zellen im Hippocampus. Dieser Befund im Zusammenhang mit der bekanntermaßen antidepressive Wirkung von Agmatin (Zomkowski et al., 2002, 2004; Aricioglu and Altunbas, 2003), sowie die chromosomale Lokalisation von Agmatinase lassen die Vermutung zu, dass Agmatin bzw. Agmatinase eine wichtige Rolle in der Pathologie affektiver Störungen beim Menschen spielen.



### 2.3.3 Stickstoffmonoxid im Gehirn

NO wurde zunächst als tumorzides und bakterizides Molekül der Makrophagen identifiziert (Hibbs et al., 1988, Stuehr et al., 1989), das bei Bedarf durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) gebildet werden kann (Lowenstein et al., 1993, Lyons et al., 1992; Xie et al., 1992). Kurze Zeit später entdeckte man NO als potenten Wirkstoff zur Vasodilatation. Man konnte zeigen, dass die meisten bekannten Vasodilatoren, wie Bradykinin, Acetylcholin oder CGRP (Calcitonin gene-related peptide) über die Freisetzung von NO zu einer Gefäßerweiterung führen (Furchgott and Zawadski 1980, Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Diese Eigenschaft erklärte auch die Wirkung von Nitroglycerin bei *Angina pectoris* Anfällen. Nitroglycerin, ein NO-Donor, führt zu einer vermehrten NO-Ausschüttung, wodurch die Herzkranzgefäße kurzzeitig dilatiert werden. Bei der oralen Applikation von Nitroglycerin wurden Kopfschmerzen immer wieder als eine häufige Nebenwirkung beschrieben (Dalsgaard-Nielsen 1955; Hansen and Drewes 1970), was auf die starke Dehnung der Hirngefäße zurückzuführen ist bzw. auf eine pathologisch veränderte Überempfindlichkeit der Hirngefäßwände auf NO, wie bei Migräneattacken der Fall (Uzar et al., 2011). NO spielt demnach bei der Entstehung von Schmerz eine Rolle. Dieser Befund wird durch andere Arbeiten bestätigt, die die Wirksamkeit von NO z.B. bei Hyperalgesie, Morphintoleranz oder Morphinabhängigkeit beschreiben (Mayer et al., 1999; Chen and Sommer, 2009).

NO wird konstitutiv nicht nur von Endothelzellen produziert, sondern auch direkt von Nervenzellen. Dies konnte erstmals durch die Stimulation von Zellen des Kleinhirns mit Glutamat gezeigt werden. Die stimulierten Kleinhirnzellen setzten NO frei, welches in Nachbarzellen zu einem cGMP-Anstieg führt (Garthwaite et al., 1988). Haupteffektorproteine des cGMP sind cGMP regulierte Phosphodiesterasen, Ionenkanäle und Proteinkinase, die ihrerseits wiederum verschiedene Aufgaben erfüllen, wie die Phosphorylierung von Ionenkanälen (Feil et al., 2005). Über diesen cGMP abhängigen Weg und über mehrere cGMP unabhängige Wege, bei denen allerdings wesentliche höhere Konzentrationen an NO nötig sind, kann NO als Neurotransmitter fungieren (Hanafy et al., 2001). Die Identifizierung des Stickstoffmonoxids als Neurotransmitter hat das klassische Bild der Neurotransmission komplett verändert. Danach war die Kommunikation zwischen einzelnen Nervenzellen an die Synapse gebunden und konnte nur in eine Richtung stattfinden, und zwar von Präsynapse zu Postsynapse. NO hingegen kann sich

unabhängig von Synapsen fast ungehindert in alle umgebene Gewebe ausbreiten. Außerdem wirkt es als retrograder Messenger, wird also postsynaptisch gebildet, um seine Wirkung dann präsynaptisch zu entfalten (Garthwaite and Boulton, 1995; Garthwaite et al., 2006). Versuche mit NOS-Knockout-Mäusen zeigten, dass NO neben der Neurotransmitterfreisetzung auch wichtige Aufgaben für die Langzeitpotenzierung, also Gedächtnis und Lernen (Son et al., 1996), sowie der Angstkonditionierung (Schafe et al., 2005) erfüllt. Auch bei neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson scheint NO eine Rolle zu spielen (Steinert et al., 2010).

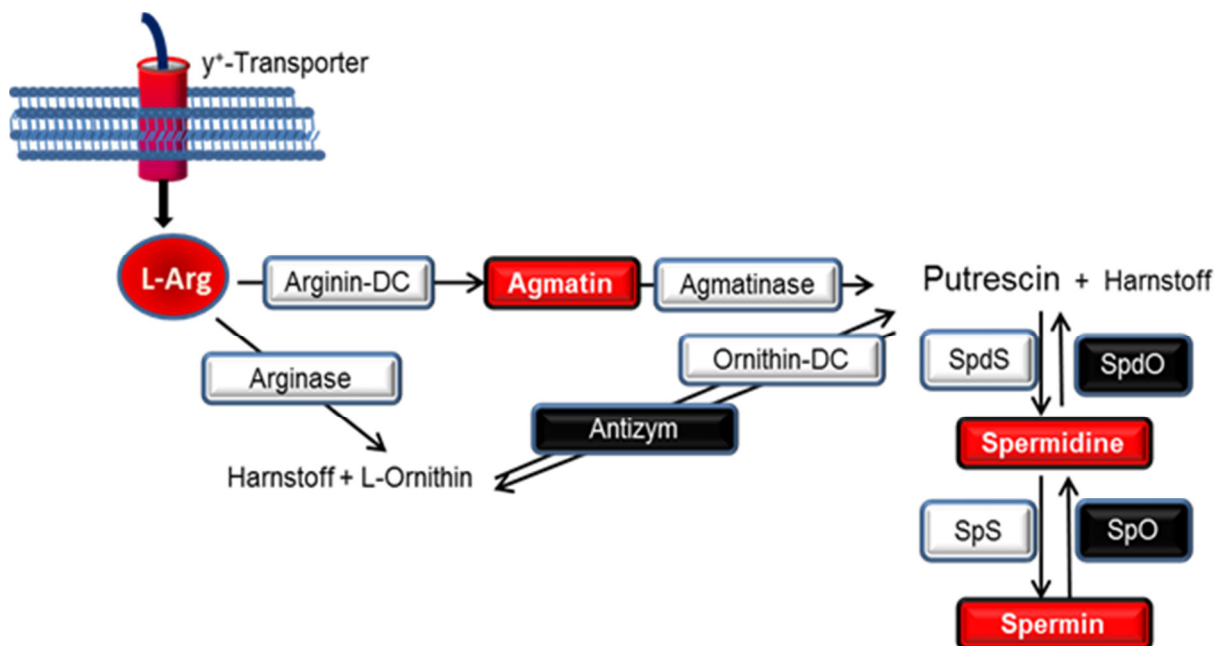
Gebildet wird NO aus L-Arginin, abhängig vom Gewebe und dessen Funktion durch die neuronale NOS (Bredt and Snyder, 1990), endotheliale NOS (Lamas et al., 1992; Sessa et al., 1992) oder induzierbare NOS (Xie et al., 1992). Zur Aktivierung der NOS ist Calmodulin, ein Kalzium-bindendes Protein, nötig, das an eNOS und nNOS allerdings erst nach der Komplexbildung mit Kalzium binden kann (Alderton et al., 2001). iNOS benötigt kein Kalzium, hier ist Calmodulin eine fest gebundene Untereinheit des Enzyms (Cho et al., 1992). Die Regulation der NO-Produktion findet hier ausschließlich über die Biosynthese des Enzyms statt. So kann die Transkription des iNOS-Gens durch proinflammatorische Zytokine (z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ ) induziert werden (Brown and Bal-Price, 2003; Schroeter et al., 2003). Für die nNOS ist die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ein entscheidender Regulator, da diese über das membranständige Protein PSD-95 (post synaptic density Protein-95) direkt mit dem NMDA-Rezeptor verbunden ist (Brenman et al., 1996; Weiss et al., 1998). eNOS und nNOS können außerdem durch Phosphorylierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase und der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase reguliert werden (Nakane et al., 1991; Bredt et al., 1992). Eine Herunterregulation der Enzymaktivität aller drei Isoformen kann u.a. über einen negativen Feedback-Mechanismus erfolgen, indem NO zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität der NOS führt (Griscavage et al., 1994).

**Fazit: NO, das direkt aus L-Arginin durch drei verschiedene Isoformen der NOS gebildet werden kann, spielt im Gehirn bei entzündlichen Prozessen, als Vasodilatator, bei der Schmerzentstehung und als Neurotransmitter eine wichtige Rolle. Als Neurotransmitter ist es im Speziellen an Gedächtnis-, Lern-**

und Verhalten-Prozessen beteiligt. Außerdem ist es in pathologische Störungen des ZNS, wie Alzheimer und Parkinson involviert.

### 2.3.4 Biogene Polyamine im Gehirn

Biogene Polyamine, wie Putrescin, Spermidin und Spermin sind kleine ubiquitär vorkommende organische Polykationen. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Neutralisierung der negativen Ladung von Makromolekülen. Über diese Eigenschaft sorgen sie für einen geregelten Ablauf des Zellzyklus (Pegg and McCann, 1982; Tabor and Tabor, 1984; Seiler and Dezeure, 1990). Sie sind essentiell für die Zellproliferation (Ray, et al., 1999), Zelldifferenzierung (Heby, 1981) und Apoptose (Thomas et al., 2001) (**Abb. 8**). Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen und Krebs. Je nach Teilungsaktivität der Zelle wird die Menge an Polyaminen in der Zelle dem jeweiligen Status der Zelle angepasst. Einmal durch ein aktives Transportsystem (Seiler et al., 1996) und zum anderen über die Regulation ihrer *de novo* Synthese.

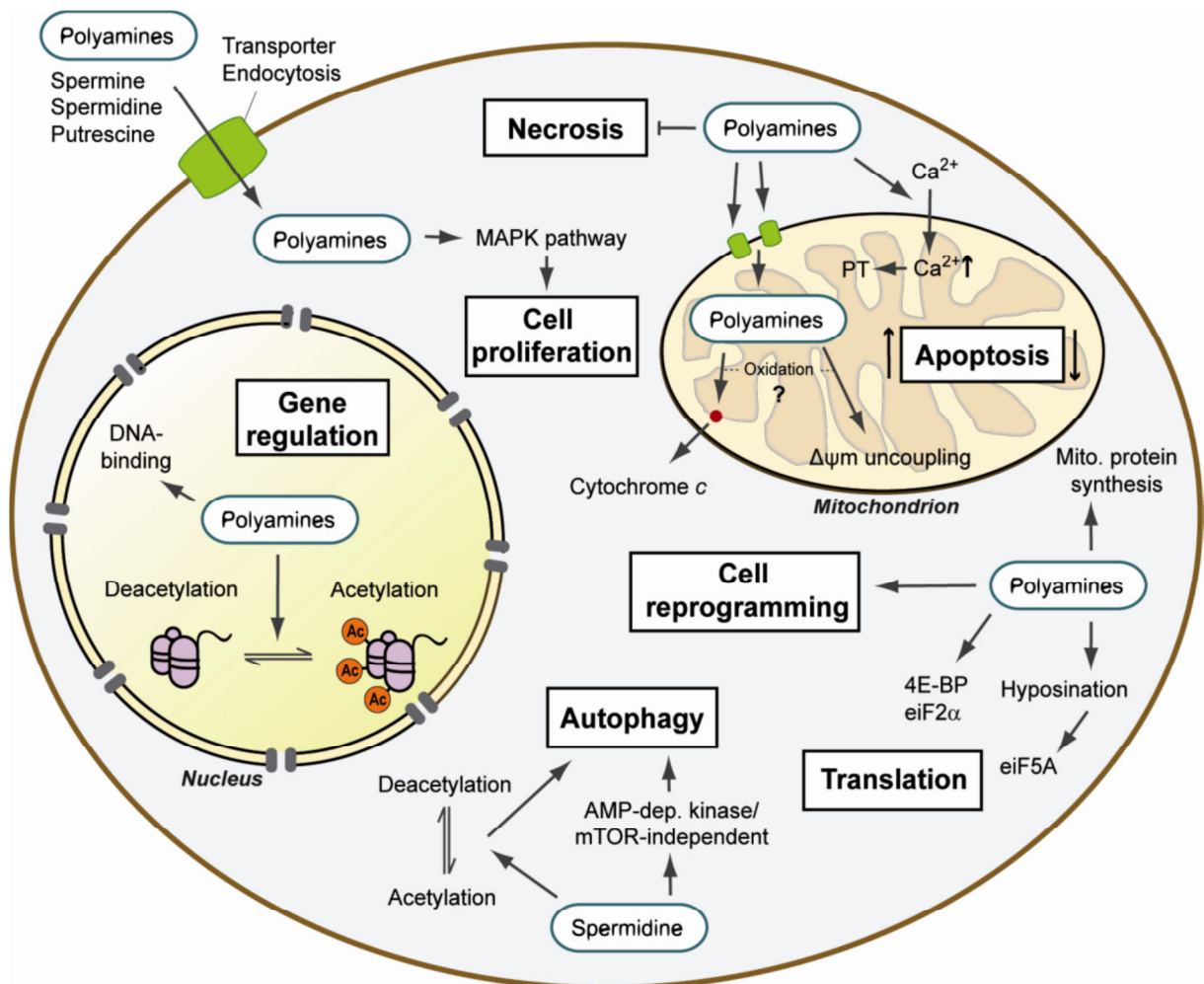


**Abbildung 7:** Polyaminmetabolismus (Modifiziert nach Seiler et al., 1998). L-Arg = L-Arginin; DC = Decarboxylase; SpdO = Spermidin-Oxidase; SpO = Spermin-Oxidase; SpdS = Spermidin-Synthase; SpS = Spermin-Synthase.

Schlüsselenzym für die Polyamin-Synthese ist das Ornithin-Decarboxylase-Protein (Coffino, 2001; Wallace et al., 2003), das über seinen Gegenspieler Ornithin-Decarboxylase-Antizym, kurz Antizym, reguliert wird. Es bindet an die Ornithin-Decarboxylase und sorgt somit für deren Abbau (Palanimurugan et al., 2004; Kurian et al., 2011), zusätzlich hemmt es den Transport von Putrescin in die Zelle (Coffino, 2001; He et al., 1994). Ein weiterer wichtiger Regulator der Polyamin-Synthese ist Agmatin, das den intrazellulären Polyamingehalt durch die Induktion des Antizyms bzw. durch die Induktion der Spermidin-Spermin-Acetyltransferase senkt (Dudkowska et al., 2003; Galea et al., 1996). Die Spermidin-Spermin-Acetyltransferase leitet die Rückreaktion der Polyamin-Synthese ein, über die die Oxidation von Spermin zu Spermidin und wieder zu Putrescin erfolgt (Casero et al., 1993) (**Abb. 7**).

Im Gehirn können Spermidin und Spermin die Erregbarkeit von Neuronen und Gliazellen beeinflussen, in dem sie unter anderem mit einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen (Kir-Kanäle) (Biedermann et al., 1998) und verschiedenen Glutamatrezeptoren (NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren) interagieren (Williams et al., 1997). Kir-Kanäle sind im Allgemeinen für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials verantwortlich und kontrollieren die Aktivierbarkeit von Neuronen und Muskelzellen. Eine Abnahme der intrazellulären Polyaminkonzentration führt bei Kir-Kanälen zu einem verstärkten  $K^+$ -Ionenausstrom und damit zu einer geringeren Erregbarkeit der Zelle (Shyng et al., 1996). Neben den Kir-Kanälen werden auch (AMPA)- und Kainat-Rezeptoren durch Polyamine reguliert (Williams, 1997). Je nach Zusammensetzung der Rezeptor-Untereinheiten kann diese Regulation inhibitorisch oder stimulatorisch ausfallen (Williams, 1997). Außerdem können sie Funktionen wie Lernen und Gedächtnis über die Interaktion mit einer Polyamin-Bindungsstelle an dem NMDA-Rezeptor modulieren (Izquierdo and Medina, 1997, Kishi et al., 1998). Da Putrescin, Spermin und Spermidin in hoher Konzentration vor allem in Regionen, die mit Gedächtnis und Lernen assoziiert sind, vorkommen (Carter, 1994) und deren Konzentrationen dort deutlich im Alter abnimmt (Liu et al., 2008a), hat man die altersbedingte Gedächtnisverminderung auf diese spezifische Änderungen der Polyaminkonzentration bezogen (Guerra et al., 2011). Obwohl Polyamine im Verdacht stehen, stehen in die Pathologie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen (z.B. Alzheimer, Parkinson, Huntington) involviert zu sein, konnte Vivo et al. keine Unterschiede in den prägnanten Hirnbereichen bei erkrankten im Vergleich zu

gesunden Hirnen feststellen (Bernstein et al., 1999; Vivo et al., 2001, Minois et al., 2011).



**Abbildung 8:** Zusammenfassung verschiedener Funktionen der Polyamine in der Zelle (Minois et al., 2011).

Nicht nur die signifikante Abnahme der Polyaminkonzentration im Alter lässt Polyamine als mögliche Anti-Aging Substanzen erscheinen, sondern auch der lebensverlängernde Effekt von exogenem Spermidin auf Hefen, Nematoden und Drosophila (Madeo et al., 2010; Eisenberg et al., 2009). 2009 konnte eine Arbeitsgruppe aus Graz einen möglichen Grund für diesen Effekt identifizieren. Exogen zugeführtes Spermidin induziert Autophagie in Zellen. Dies erhöht die Lebensspanne der Zelle, indem sie epigenetische Modifikationen der Zelle auslöst und Nekrose unterdrückt (Eisenberg et al., 2009).

**Fazit: Die Bereitstellung von Polyaminen in der Zelle wird maßgeblich durch ihren Transport und ihre *de novo* Synthese bestimmt. Letztere nimmt im Alter, vor allem im Gehirn signifikant ab. Einer der wichtigsten Regulatoren der *de novo* Synthese der Polyamine ist Agmatin.**

### 2.4 Transport von L-Arginin im Gehirn

Es gibt vier mögliche Quellen über die L-Arginin das ZNS erreichen kann. 1) Über die Blut-Hirn-Schranke aus dem Blut (O’Kane et al. 2006), 2) über die Cerebrospinalflüssigkeit der Ependymzellen des Plexus choroideus, 3) durch Proteindegradation und 4) über enzymatisches Recycling aus dem Harnstoffzyklus (Braissant et al. 2001, Wiesinger 2001; Gensert and Ratan, 2006). Wie in den vorherigen Kapiteln (1, 2.1) besprochen, können kationische Aminosäuren über zwei Transporterfamilien transportiert werden. Über die CAA-Familie, die durch den  $\gamma^+$ -Transporter repräsentiert wird und über die BAT-Familie, deren Mitglieder die  $\text{b}0^+$ ;  $\text{B}0^+$  und  $\gamma^+$ -L-Transporter sind. Über die Bluthirnschranke wird der Transport der kationischen Aminosäuren ausschließlich über den  $\gamma^+$ -Transporter gewährleistet (O’Kane et al., 2006). Auch der Transport der kationischen Aminosäuren direkt in die Zellen des Gehirns scheint nahezu ausschließlich über den  $\gamma^+$ -Transporter gewährleistet zu werden (Braissant et al., 1999; Stevens and Vo, 1998; Wiesinger et al., 2001). Obwohl die Expression der Transporter  $\gamma^+$ L (Tan und Ng, 1995),  $\text{B}0^+$  und  $\gamma^+$ -LAT1/4F2hc (Bröer et al., 2000) im Gehirn, in kultivierten Astrozyten und in Neuronen nachgewiesen wurde, konnte ein physiologischer Influx der kationischen Aminosäuren über diese Transporter bislang nicht bestätigt werden (Wiesinger et al., 2001).

Die außerordentliche Bedeutung des  $\gamma^+$ -Transporters für verschiedene Hirnfunktionen wurde in einem Artikel von Huang et al. (2007) beschrieben. Huang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sich die CAT1/3-Expression und die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren gegenseitig beeinflussen. So vermindert die NMDA-Rezeptor-Aktivierung die Oberflächenexpression von CAT1 und 3 und somit den L-Arginintransport in die Zelle. Ein Knockdown der CAT1 und 3 RNA hat wiederum Einfluss auf den mTOR-Weg über die NMDA-Rezeptor-Aktivierung und direkt auf die Ausbildung des Wachstumskegels und der dendritischen Spines (Huang et al., 2007). Diese Prozesse sind von großer Bedeutung für die neuronale Plastizität

und spielen eine wichtige Rolle bei Degenerations- und Regenerationsvorgängen nach neuronaler Schädigung. Außerdem ist bekannt das NMDA-Rezeptoren in verschiedene neurologische, neurodegenerative und psychiatrische Störungen involviert sind (Waxman and Lynch, 2005), wie auch direkt in Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung (Morris et al., 2013). Somit scheint die Expression und Aktivität des  $\gamma^+$ -Transporters umfangreichen Einfluss auf diverse neuronale Funktionen zu haben. Bislang gab es jedoch nur unzureichende Untersuchungen zur Verteilung der CAT-Proteine im Gehirn, die funktionelle Rückschlüsse zulassen könnten. Untersuchungen zur Expression des Transporters beziehen sich bislang auf primäre Neurone (Westergaard et al., 1993; Stevens and Vo, 1998), Zelllinien mit neuronalen Eigenschaften (Tan and Ng, 1995; Schmidlin and Wiesinger, 1994), Gliazellen (Schmidlin and Wiesinger, 1994) und Gewebeschnitte (Hosokawa et al., 1997; 1999; Ito and Groudine, 1997), die nahezu alle aus tierischem Gewebe isoliert wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CAT3 der Rodentia im adulten Tier ausschließlich im Gehirn exprimiert wird (Hosokawa et al., 1997). Die Spezifizierung des Proteins auf ein Gewebe vollzieht sich erst nach der Geburt, embryonal wird CAT3 ubiquitär exprimiert (Nicholson et al., 1998). Auch ist diese Gewebespezifisierung nicht speziesübergreifend. Beim Menschen wird hCAT3 mRNA eher in peripherem Gewebe, wie Thymus, Uterus und Brustdrüse exprimiert (Vekony et al., 2001). Diese Untersuchungen geben erste Hinweise zur Verteilung der CAT-Transkripte im menschlichen Gehirn. Dot blot Untersuchungen mit cDNA der 3 Transkripte zeigen eine diffuse Verteilung von hCAT1 und 2 im gesamten menschlichen Gehirn. Für hCAT3 zeigt sich eher eine Häufung in den Basalganglien und im limbischen System, als im Großhirn (Vekony et al., 2001).

**Fazit: Der  $\gamma^+$ -Transporter scheint Haupttransporter und lokal zum Teil der einzige funktionelle Transporter kationischer Aminosäuren im Gehirn zu sein. Genaue Untersuchungen zur Expressionsverteilung des Transporters im menschlichen Gehirn stehen bislang jedoch noch aus.**

### **2.4.1 Die Verteilung des $\gamma^+$ -Transporters im menschlichen Gehirn**

Dieses Kapitel wurde beschrieben und publiziert im Manuskript:

**Jäger K**, Wolf S, Dobrowolny H, Steiner J, Nave H, Maronde E, Bogerts B, Bernstein HG. (2013) Differential topochemistry of three cationic amino acid transporter proteins, hCAT1, hCAT2 and hCAT3, in the adult human brain. *Amino Acids*. 44(2):423-33

Die Arbeit beschreibt die regionale und zelluläre Verteilung der kationischen Aminosäure Transport Proteine hCAT1, 2 und 3 im gesunden adulten Gehirn. Alle drei Proteine werden hauptsächlich in Neuronen, aber auch in Astrozyten, Oligodendrozyten, Plexus choroideus, sowie in kleinen Blutgefäßen exprimiert. Hinsichtlich ihrer regionalen Verteilung gibt es Expressionsunterschiede, insbesondere unterscheidet sich die Verteilung von hCAT2 zu 1 und 3. Das Verteilungsmuster von hCAT1 und 3 ist in den einzelnen untersuchten Gehirnregionen recht ähnlich. Beide Proteine kommen in nahezu allen Regionen gleichermaßen vor, im Gegensatz dazu ist hCAT2 im Hirnstamm und Cerebellum nicht nachweisbar. Diese detaillierte Studie des Verteilungsmusters der drei Proteine lässt erstmals Rückschlüsse auf funktionelle Fragestellungen der einzelnen Proteine zu.



### 3. Zusammenfassung

Die vorliegenden Ergebnisse geben einen detaillierten Einblick in die Verteilung des  $\gamma^+$ -Transporters in Geweben der Augenoberfläche und des Gehirns sowohl in gesundem, als auch in pathologisch verändertem Gewebe. Hierbei zeigt sich erstmals, dass nicht nur hCAT2 im Rahmen von inflammatorischen Prozessen reguliert wird, sondern auch hCAT1. Stimulationsversuche mit verschiedenen Zytokinen und Gram positiven bzw. negativen Bakterien untermauern dieses Ergebnis. Die ausgeprägte Regulation der  $\gamma^+$ -Transporterproteine unter entzündlichen Bedingungen zeigt die Relevanz des Transporters für das Immunsystem. Außer der Betrachtung der L-Argininverfügbarkeit für die NO-Produktion wurde in der Literatur bislang kein weiterer Zusammenhang zum angeborenen Immunsystem in Betracht gezogen. Beta Defensine stellen als antimikrobielle Peptide jedoch gute Kandidaten für einen weiteren Link zwischen den kationischen Aminosäure Transportern und dem Immunsystem dar. Die Produktion der Defensine erfordert eine große Menge der kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Arginin, die durch das  $\gamma^+$ -Transportsystem in die Zelle geschafft werden könnten. Experimente zur Blockade der Hauptstoffwechselwege des L-Arginins und eine zusätzliche Expressionsstimulation der  $\beta$ -Defensine hBD1, 2 und 3 zeigen, dass die  $\beta$ -Defensinproduktion direkt von der Aktivität und Expression des  $\gamma^+$ -Transporters abhängig ist. Dieses Ergebnis brachte erstmals einen weiteren wichtigen Zusammenhang zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem  $\gamma^+$ -Transporter, neben dessen Bedeutung für die NO-Produktion in Makrophagen.

Untersuchungen zur Konzentrationsänderung der L-Arginin-Metabolite, Agmatin und Harnstoff im Rahmen entzündlicher Erkrankungen rücken den  $\gamma^+$ -Transporter als limitierenden Faktor zur Bereitstellung von L-Arginin und damit als Angriffspunkt für Therapeutika in den Vordergrund. Es konnte gezeigt werden, dass Harnstoff, der in Geweben der Augenoberfläche aus L-Arginin metabolisiert wird, in der Tränenflüssigkeit von Patienten mit einem diagnostizierten Trockenen Auge in einer 50% geringeren Konzentration nachweisbar ist, als in Tränenflüssigkeit von gesunder Probanden. Dieses Ergebnis und das Expressionsmuster Harnstoff-produzierender Enzyme an der Augenoberfläche, weist Parallelen zu Befunden in pathologisch trockener Haut im Vergleich zu Gesunder Haut auf. Somit konnte erstmals gezeigt

werden, dass Harnstoff in der Tränenflüssigkeit, nicht wie bislang vermutet nur ein Stoffwechselprodukt ist, sondern ähnlich wie in der Haut, eine physiologische Rolle hat. Da Harnstoff selbst irritativ wirkt, kommen als Angriffspunkt zur Therapie des Trockenen Auges vor allem die einzelnen Harnstoffproduzierten Enzyme sowie L-Arginin und sein Transportsystem, der  $\gamma^+$ -Transporter, in Betracht.

Agmatin bzw. sein abbauendes Enzym, die Agmatinase, wurde in Gesunden und in pathologisch veränderten Gehirnen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Agmatin, das auch im Gehirn vor allem aus L-Arginin metabolisiert wird, scheinbar eine wichtige Rolle für die physiologische Funktionalität neuronaler Prozesse spielt. Eine Verminderung seiner Konzentration, welche mit einer Erhöhung der Agmatinase einhergehen würde, spielt scheinbar eine Rolle in der Pathologie affektiver Störungen beim Menschen.

So kann man abschließend sagen, dass die in dieser Arbeit zusammengefassten Ergebnisse zur Expression und Regulation des  $\gamma^+$ -Transporters, als wichtige Erkenntnisse zum Verständnis pathologischer Ereignisse verschiedener entzündlicher Erkrankungen an der Augenoberfläche und im Gehirn beigetragen haben. Darüber hinaus bilden sie eine wichtige Grundlage zur Erforschung neuer therapeutischer Strategien gegen unterschiedliche entzündliche Erkrankungen mit mikrobiellem Hintergrund. In der Zukunft könnten daraus Alternativen zum Einsatz von Antibiotika entstehen, die durch immer weiter steigende Resistenzbildungen der Mikroorganismen zunehmend essentieller werden.

### 4. Literaturverzeichnis

1. Alba-Roth J, Muller OA, Schopohl J, von Werder K. (1988) Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 67:1186-1189
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357(3):593-615
3. Anderson JO and Dobson DC. (1959) Amino acids requirements of the chick: effect of total essential amino acid level in the diet on the arginine and lysine requirements. *Poultry Sci.* 38:1140-1147
4. Akinci A, Cakar N, Kara N, Uncu N. (2009) Ocular findings in children with chronic renal failure. *Cornea.* 28:5-6
5. Akinci A, Cetinkaya E, Aycan Z. (2007) Dry eye syndrom in diabetic children. *Eur J Ophthalmol.* 7:873-878
6. Apostol AT and Tayek JA. (2003) A decrease in glucose production is associated with an increase in plasma citrulline response to oral arginine in normal volunteers. *Metabolism.* 52(11):1512-1516
7. Aricioglu F, Altunbas H (2003) Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? *Ann N Y Acad Sci.* 1009:136-40
8. Auguet M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE. (1995) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. *Jpn. J. Pharmacol.* 69 (3):285–287
9. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. (1990) Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery.* 108(2):331-7
10. Barbul A. (1995) The use of arginine in clinical practice. *Amino Acid Metabolism and Therapy in Health and Nutritional Disease*, edited by Cynober LA. Boca Raton FL: CRC, 361-372
11. Bauch C, Forster N, Loffing-Cueni D, Summa V, Verrey F. (2003) Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 278(2):1316-22
12. Baum J. (1995) Infection of the eye. *Clin Infect Dis.* 21:479-488
13. Beisswenger C, Bals R. (2005) Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr Protein Pept Sci.* 6:255-264
14. Bernstein HG, Stich C, Jäger K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J. et al. (2012) Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology* 62 (1): 237–246
15. Bernstein HG, Derst C, Stich C, Prüss H, Peters D, Krauss M, Bogerts B, Veh RW, Laube G. (2011) The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain? *Amino Acids.* 40(2):453-65
16. Bernstein HG, Müller M. (1999) The cellular localization of the L-ornithine decarboxylase/polyamine system in normal and diseased central nervous systems. *Prog Neurobiol.* 57:485-505

17. Bertran J, Magagnin S, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Kühn LC, Palacin M, Murer H. (1992): Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12):5606-5610
18. Biedermann B, Skatchkov SN, Brunk I, Bringmann A, Pannicke T, Bernstein HG, Faude F, Germer A, Veh R, Reichenbach A. (1998) Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Müller) cells and controls distinct K<sup>+</sup> channels of their membrane. *Glia*. 23(3):209-20
19. Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C (1999) L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*. 70:231-241
20. Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C (2001) Differential expression of the cationic amino acid transporter 2(B) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 91:189-195
21. Bredt DS, Snyder SH. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(2):682-685
22. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH. (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem*. 267(16):10976-10981
23. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. 84(5):757-767.
24. Brennan NA, Chantal Coles ML. (1997) Extended wear in perspective. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 74:609-623.
25. Bröer A, Wagner CA, Lang F, Bröer S. (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J*. 349(3):787-795.
26. Brown GC, Bal-Price A. (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol*. 27(3):325-355
27. Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Do Nascimento CA, Burewicz A, Malinski T. (1999) Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J Physiol Pharmacol*. 50(4):575-586
28. Butovich IA, Millar TJ, Ham BM. (2008) Understanding and analyzing meibomian lipids: a review. *Curr Eye Res*. 33:405-420
29. Caballero-Herrera A, Nordstrand K, Berndt KD, Nilsson L. (2005) Effect of urea on peptide conformation in water: molecular dynamics and experimental characterization. *Biophys J*. 89(2):842-857
30. Carter C. (1994) Neuropharmacology of polyamines. Academic Press, University of Michigan, ISBN 0121616401, 9780121616403
31. Casero RA, Pegg AE. (1993) Spermidine/spermine N1-acetyltransferase-the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J*. 7(8):653-661

32. Chen Y, Sommer C. (2009) The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in morphine tolerance and dependence. *Mol Neurobiol.* 40(2):101-107
33. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med.* 176(2):599-604
34. Christensen HN, Antonioli JA. (1969) 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
35. Closs EI, Albritton LM, Kim JW, Cunningham JM. (1993) Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem.* 268:7538-7544
36. Closs EI, Gräf P, Habermeier A, Cunningham JM, Förstermann U. (1997) Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochem.* 36:6462-6468
37. Closs EI. (2002) Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 11(1):99-107
38. Closs EI, Leibach F. (2006) Transport of peptides, amino acids, and derivatives. *Amino Acids.* 31(2):91
39. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. (2007) Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol.* 213(2):67-77
40. Coffino P. (2001) Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie* 83:319–323
41. Coffino P. (2001) Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(3):188–194
42. Dale BA, Fredericks LP. (2005) Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 7(2):119-133
43. DALSGAARD-NIELSEN T. (1955) Migraine diagnostics with special reference to pharmacological tests. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 7(4-6):312-322
44. Deves R, Chavez P, Boyd CA. (1992) Identification of a new transport system (y<sup>+</sup>L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol.* 454:491-501
45. Devés R and Boyd CAR. (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Review.* 78(2):487-545
46. Dudkowska M, Lai J, Gardini G, Stachurska A, Grzelakowska-Sztabert B, Colombatto S, Manteuffel-Cymborowska M. (2003) Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of polyamines and cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 1619 (2):159–166
47. Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. (2002) Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology.* 106(4):517-25
48. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E,

- Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstein B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* 11(11):1305-1314
49. Farkas A, Vámos R, Bajor T, Müllner N, Lázár A, Hrabá A. (2003) Utilization of lacrimal urea assay in the monitoring of hemodialysis: conditions, limitations and lacrimal arginase characterization. *Exp Eye Res.* 76(2):183-192
50. Feil R, Hofmann F, Kleppisch T. (2005) Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci.* 16(1):23-41
51. Feng Y, Piletz JE, Leblanc MH. (2002) Agmatine suppresses nitric oxide production and attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 52(4):606–611
52. Figueroa XF, Martinez AD, Gonzalez DR, Jara PI, Ayala S, Boric MP. (2001) In vivo assessment of microvascular nitric oxide production and its relation with blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(3):1222-1231
53. Fleisig SMJ, Efron N, Pier GB. (1992) Extended contact lens wear enhances *Pseudomonas aeruginosa* adherence to human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33:2908-2916
54. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23(6):1121–1131
55. Freitas D, Alvarenga L, Sampaio J, Mannis M, Sato E, Sousa L, Vieira L, Yu MC, Martins MC, Hoffling-Lima A, Belfort R Jr. (2003) An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. *Ophthalmology.* 110:276-285
56. Fujii G, Selsted ME, Eisenberg D. (1993) Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci.* 2(8):1301-1312
57. Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288(5789):373-376
58. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. (1996) Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem. J.* 316 (1):247–249
59. Ganz T, Weiss J. (1997) Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol.* 34:343-354
60. Ganz T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720
61. García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. (2001) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306(2):257-264

62. Garg P, Bansal AK, Sharma S, Vemuganti GK. (2001) Bilateral infectious keratitis after laser in situ keratomileusis: a case report and review of the literature. *Ophthalmol.* 108:121-125
63. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336(6197):385-388
64. Garthwaite J, Boulton CL. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 57:683-706
65. Garthwaite G, Bartus K, Malcolm D, Goodwin D, Kollb-Sielecka M, Dooleniya C, Garthwaite J. (2006) Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide. *J Neurosci.* 26(29):7730-7740
66. Garreis F, Schlorf T, Worlitzsch D, Steven P, Bräuer L, Jäger K, Paulsen FP. (2010) Roles of human  $\beta$ -defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells. *Histochem Cell Biol.* 134(1):59-73
67. Gensert JM and Ratan RR (2006) The metabolic coupling of arginine metabolism to nitric oxide generation by astrocytes. *Antioxidants Redox Signaling.* 8:919-928
68. Gilad GM, Gilad VH, Rabey JM. (1996) Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain: coincidental changes during development and after ischemia. *Neurosci Lett.* 216(1):33-36
69. Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, Borchman D, Paulsen F, Barabino S, Glasgow BJ. (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in health and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(4):1979-1993
70. Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y, Ignarro LJ. (1994) Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J Biol Chem.* 269(34):21644-21649
71. Gritz DC, Witcher JP. (1998) Topical issues in the treatment of bacterial keratitis. *Int Ophthalmol Clin.* 38:107-114
72. Guerra GP, Mello CF, Bochi GV, Pazini AM, Fachineto R, Dutra RC, Calixto JB, Ferreira J, Rubin MA. (2011) Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 96(2):324-332.
73. Hammermann R, Brunn G, Racké K. (2001) Analysis of the genomic organization of the human cationic amino acid transporters CAT-1, CAT-2 and CAT-4. *Amino Acids.* 21(2):211-219
74. Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit.* (4):801-819
75. Hansen HJ, Drewes VM. (1970) The nitroglycerine ointment test-a double-blind examination. *Dan Med Bull.* 17(8):226-229

76. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. (2001) Isolation and characterization of human beta defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 276:5707-5713
77. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 387:861-869
78. Haulică I, Bild W, Iliescu R, Georgescu R, Frunză F. (1999) Preliminary research on possible relationship of NO with agmatine at the vascular level. *Rom J Physiol.* 36 (1-2):67-79
79. He Y, Suzuki T, Kashiwagi K, Igarashi K. (1994) Antizyme delays the restoration by spermine of growth of polyamine-deficient cells through its negative regulation of polyamine transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203(1):608-614
80. Heby O. (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation.* 19(1):1-20
81. Hibbs JB (jr), Taintor RR, Vavarin Z, Rachlin EM. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 157(1):87-94
82. Hill CP, Yee J, Selsted ME, Eisenberg D. (1991) Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science.* 251(5000):1481-1485
83. Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Puri A, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowski J. (2000) The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem.* 275(42):32911-32918
84. Hoshida R, Ikeda Y, Karamshima 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 transporter2 (HCAT2) *Genomics.* 38:174-178
85. Hosokawa H, Sawamura T, Kobayashi S, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. (1997) Cloning and characterization of a brain-specific cationic amino acid transporter. *Brain Research.* 272:8717-8722
86. Hosokawa H, Ninomiya H, Sawamura T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Fujiwara K, Masaki T. (1999) Neuron-specific expression of cationic amino acid transporter 3 in the adult rat brain. *Brain Res.* 838 (1-2):158-165
87. Huang Y, Kang BN, Tian J, Liu Y, Luo HR, Hester L, Snyder SH. (2007) The cationic amino acid transporters CAT1 and CAT3 mediate NMDA receptor activation-dependent changes in elaboration of neuronal processes via the mammalian target of rapamycin mTOR pathway. *J Neurosci.* 27(3):449-458
88. Humphreys-Beher, M. G. (1996) Animal models for autoimmune disease-associated xerostomia and xerophthalmia. *Adv. Dent. Res.* 10(1):73-75.
89. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(24):9265-9269
90. Ishizuka S, Cunard R, Poucell-Hatton S, Wead L, Lortie M, Thomson SC. et al. (2000) Agmatine inhibits cell proliferation and improves renal function in anti-thy-1 glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 (12):2256-2264



91. Ito K, Groudine M. (1997) A new member of cationic amino acid transporter family is referentially expressed in adult mouse brain. *J Biol Chem.* 272(42):26780-26786
92. Iyer RK, Kim HK, Tsoa RW, Grody WW, Cederbaum SD. (2002) Cloning and characterization of human agmatinase. *Mol Genet Metab.* 75(3):209-218
93. Izquierdo I, Medina JH. (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68(3):285-316
94. Jäger K, Bönisch U, Risch M, Worlitzsch D, Paulsen F. (2009) Detection and Regulation of Cationic Amino Acid Transporters in Healthy and Diseased Ocular Surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (3):1112–1121
95. Jäger K, Wolf S, Dobrowolny H, Steiner J, Nave H, Maronde E, Bernstein HG. (2013) Differential topochemistry of three cationic amino acid transporter proteins, hCAT1, hCAT2 and hCAT3, in the adult human brain. *Amino Acids* 44 (2):423–433
96. Jäger K, Garreis F, Posa A, Dunse M, Paulsen FP. (2010) Functional relationship between cationic amino acid transporters and  $\beta$ -defensins: Implications for dry skin diseases and the dry eye. *Annals of Anatomy.* 192 (2): 65–69
97. Jäger K, Nielitz A, Garreis F, Sel S, Nave H, Paulsen FP (2011) In vitro evidence of involvement of the epithelial  $\gamma^+$  transporter in  $\beta$ -defensin production on the ocular surface. *Annals of Anatomy.* 193 (6):479–485
98. Jain-Vakkalagadda B, Pal D, Gunda S, Nashed Y, Ganapathy V, Mitra AK. (2004) Identification of a Na<sup>+</sup>-dependent cationic and neutral amino acid transporter, B(0,+), in human and rabbit cornea. *Mol. Pharm.* 1(5):338–346
99. Jessberger B. (1988) Therapy of the symptoms of "dry skin". *Z Hautkr.* 63(3):12-15
100. Kakuda DK, Sweet MJ, MacLeod CL, Hume DA, Markovich D. (1999) CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem. J.* 340(2):549–553
101. Karabulut AA, Yalvac IS, Vahaboglu H, Nurozler AB, Duman S. (1999) Conjunctival impression cytology and tear-film changes in patients with psoriasis. *Cornea.* 18(5):544-548
102. Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. (1991) Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature.* 352(6337):725-728
103. Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A. (1993) Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery.* 114(2):155-160
104. Kishi A, Ohno M, Watanabe S. (1998) Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. *Neurosci Lett.* 257(3):131-134
105. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. (1998) Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.* 66(9):4222-4228
106. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. (2000) Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in

- oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun.* 68(5):2907-2915
107. Kurian L, Palanimurugan R, Gödderz D, Dohmen RJ. (2011) Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature* 477(7365):490–494
108. Ky W, Scherick K, Stenson S. (1998) Clinical survey of lens care in contact lens patients. *CLAO J.* 24(4):216-219
109. Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner BM, Marsden PA. (1992) Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 90(3):879-887
110. Lavinsky D, Arteni NS, Netto CA. (2003) Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav Brain Res.* 141(1):19-24
111. Lehrer RI. (2004) Primate defensins. *Nat Rev Microbiol.* 2:727-738
112. Lehrer RI, Ganz T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 11:23-27
113. Leitch B, Shevtsova O, Reusch K, Bergin DH, Liu P. (2011) Spatial learning-induced increase in agmatine levels at hippocampal CA1 synapses. *Synapse.* 65(2):146-153
114. Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. (1994) Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science.* 263(5149):966-969
115. Liu P, Rushaidhi M, Collie ND, Leong MT, Zhang H. (2008) Behavioral effects of intracerebroventricular microinfusion of agmatine in adult rats. *Behav Neurosci.* 122(3):557-569
116. Liu P, Gupta N, Jing Y, Zhang H. (2008a) Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats. *Neuroscience.* 155(3):789-796
117. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15;90(20):9730-9734
118. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* 267(9):6370-6374
119. Madeo F, Eisenberg T, Büttner S, Ruckenstuhl C, Kroemer G. (2010) Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy.* 6(1):160-162
120. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Raco G, Bottai D, Favilli F, Florio W, Campa M. (2005) Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(3):1245-1248
121. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. (1999) Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(14):7731-7736
122. McCulley JP, Shine W. (1997) A compositional based model for the tear film lipid layer. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 95:79–88

123. McDermot AM. (2004) Defensins and other antimicrobial peptides at the ocular surface. *The Ocular Surface*. 2:229-247
124. McDermott AM. (2009) The role of antimicrobial peptides at the ocular surface. *Ophthalmic Res*. 41(2):60-75
125. McGuffin P, Knight J, Breen G, Brewster S, Boyd PR, Craddock N, Gill M, Korszun A, Maier W, Middleton L, Mors O, Owen MJ, Perry J, Preisig M, Reich T, Rice J, Rietschel M, Jones L, Sham P, Farmer AE. (2005) Whole genome linkage scan of recurrent depressive disorder from the depression network study. *Hum Mol Genet*. 14(22):3337-3345
126. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. (2011) Polyamines in aging and disease. *Aging Albany NY*. 3(8):716-732
127. Mistry SK, Burwell TJ, Chambers RM, Rudolph-Owen L, Spaltmann F, Cook WJ, Morris SM Jr. (2002) Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282(2):375-381
128. Morris SM Jr. (2004) Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr*. 134(10):2743-2747; discussion 2765-2767
129. Morris RGM, Steele RJ, Bell JE, Martin SJ. (2013) N -methyl- d -aspartate receptors, learning and memory: chronic intraventricular infusion of the NMDA receptor antagonist d-AP5 interacts directly with the neural mechanisms of spatial learning. *Eur J Neurosci*, S. n/a.
130. Motzkus D, Schulz-Maronde S, Heitland A, Schulz A, Forssmann WG, Jübner M, Maronde E. (2006) The novel beta-defensin DEFB123 prevents lipopolysaccharide-mediated effects in vitro and in vivo. *FASEB J*. 20(10):1701-1702
131. Nakane M, Mitchell J, Förstermann U, Murad F. (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 180(3):1396-1402
132. Nguyen H, Oanh X, Goracke-Postle CJ, Kaminski LL, Overland ACI Morgan AD, Fairbanks CA. (2003) Neuropharmacokinetic and dynamic studies of agmatine (decarboxylated arginine). *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1009:82–105
133. Nicolas P, Mor A. (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol*. 49:277-304
134. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, Lemp MA, Sullivan DA. (2011) The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Executive Summary *IOVS* 52:1922-1929
135. Nicholson B, Manner CK, Kleeman J, MacLeod CL. (2001) Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J. Biol. Chem*. 276 (19):15881–15885
136. Nicholson B, Sawamura T, Masaki T, MacLeod CL. (1998) Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines. *J Biol Chem*. 273(24):14663-14666

137. Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. (2004) Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci. *Curr Microbiol.* 48(2):85-87
138. Nissim I, Horyn O, Daikhin Y, Nissim I, Lazarow A, Yudkoff M. (2002) Regulation of urea synthesis by agmatine in the perfused liver: studies with <sup>15</sup>N. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283(6):1123-1134
139. O'Callaghan RJ, Cellegan MC, Moreau JM, Green LC, Foster TJ, Hartford OM, Engel LS, Hill JM. (1997) Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect Immun.* 65:1571-1578
140. O'Kane RL, Viña JR, Simpson I, Zaragoza R, Mokashi A, Hawkins RA (2006) Cationic amino acid transport across the blood-brain barrier is mediated exclusively by system y<sup>+</sup>. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:412-419
141. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. (2003) Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis.* 62(2):17-21
142. Ozden O, Kayir H, Ozturk Y, Uzbay T. (2011) Agmatine blocks ethanol-induced locomotor hyperactivity in male mice. *Eur J Pharmacol.* 659(1):26-29
143. Palacín M, Estévez R, Bertran J, Zorzano A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 78(4):969-1054
144. Palanimurugan R, Scheel H, Hofmann K, Dohmen RJ. (2004) Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO J.* 23 (24): 4857–4867
145. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327(6122):524-526
146. Paszcuk AF, Gadotti VM, Tibola D, Quintão NL, Rodrigues AL, Calixto JB, Santos AR. (2007) Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. *Brain Res.* 1159:124-133
147. Patrzykat A, Douglas SE. (2005) Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protection. *Protein Pept Lett.* 12:19-25
148. Pegg AE, McCann PP. (1982) Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243 (5):212-221
149. Perkins CP, Mar V, Shutter JR, del Castillo J, Danilenko DM, Medlock ES, Ponting IL, Graham M, Stark KL, Zuo Y, Cunningham JM, Bosselmann RA. (1997) Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT. *Genes Dev.* 11:914-925
150. Rau G, Seedor JA, Shah MK, Ritterband DC, Koplín RS. (2008) Incidence and clinical characteristics of enterococcus keratitis. *Cornea.* 27(8):895-899
151. Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR. (1999) Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* 276:684-691
152. Regunathan S. (2006) Agmatine: biological role and therapeutic potentials in morphine analgesia and dependence. *AAPS J.* 8(3):479-484

153. Regunathan S, Piletz JE. (2003) Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009:20–29
154. Reis DJ, Regunathan S. (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci.* 21(5):187-193
155. Reis DJ, Regunathan S. (1998) Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. *J Auton Nerv Syst.* 72(2-3):80-85
156. Ridley F. (1930) The intraocular pressure and drainage of the aqueous humour. *Brit. J. exp. Path.* 11:217-240
157. Rodríguez-Jiménez FJ, Krause A, Schulz S, Forssmann WG, Conejo-Garcia JR, Schreeb R, Motzkus D. (2003) Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics.* 81(2):175-183
158. Rotmann A, Strand D, Martiné U, Closs EI. (2004) Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. *J Biol Chem.* 279(52):54185-54192
159. Rotmann A, Vékony N, Gassner D, Niegisch G, Strand D, Martiné U, Closs EI. (2006) Activation of classical protein kinase C reduces the expression of human cationic amino acid transporter 3 (hCAT-3) in the plasma membrane. *Biochem J.* 395(1):117-123
160. Satriano J, Isome M, Casero RA, Thomson SC, Blantz RC. (2001) Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 281(1):C329-334
161. Satriano J, Matsufuji S, Murakami Y, Lortie MJ, Schwartz D, Kelly CJ et al. (1998) Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J. Biol. Chem.* 273 (25):15313–15316
162. Satriano J, Schwartz D, Ishizuka S, Lortie MJ, Thomson SC, Gabbai F. et al. (2001) Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis. *J. Cell. Physiol.* 188 (3):313–320
163. Schafe GE, Bauer EP, Rosis S, Farb CR, Rodrigues SM, LeDoux JE. (2005) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur J Neurosci.* 22(1):201-211
164. Schmidlin A, Wiesinger H. (1994) Transport of L-arginine in cultured glial cells. *Glia.* 11(3):262-268
165. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. (2005) Human defensins. *J Mol Med (Berl).* 83(8):587-595
166. Schramm L, La M, Heidbreder E, Hecker M, Beckman JS, Lopau K, Zimmermann J, Rendl J, Reiners C, Winderl S, Wanner C, Schmidt HH. (2002) L-arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney Int.* 61(4):1423-1432
167. Schröder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J. et al. (2011) Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1. *Nature* 469 (7330):419–423

168. Schröder JM, Harder J. (2006) Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci.* 63(4):469-486
169. Schröder JM. Epithelial peptide antibiotics. (1999) *Biochem Pharmacol.* 57:121-134
170. Schroeter M, Küry P, Jander S. (2003) Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 117(1):1-7
171. Schumacher J, Kaneva R, Jamra RA, Diaz GO, Ohlraun S, Milanova V, Lee YA, Rivas F, Mayoral F, Fuerst R, Flaquer A, Windemuth C, Gay E, Sanz S, González MJ, Gil S, Cabaleiro F, del Rio F, Perez F, Haro J, Kostov C, Chorbov V, Nikolova-Hill A, Stoyanova V, Onchev G, Kremensky I, Strauch K, Schulze TG, Nürnberg P, Gaebel W, Klimke A, Auburger G, Wienker TF, Kalaydjieva L, Propping P, Cichon S, Jablensky A, Rietschel M, Nöthen MM. (2005) Genomewide scan and fine-mapping linkage studies in four European samples with bipolar affective disorder suggest a new susceptibility locus on chromosome 1p35-p36 and provides further evidence of loci on chromosome 4q31 and 6q24. *Am J Hum Genet.* 77(6):1102-1111
172. Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (8):843–861
173. Seiler N, Dezeure F. (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int. J. Biochem.* 22 (3):211–218
174. Seo S, Liu P, Leitch B. (2011) Spatial learning-induced accumulation of agmatine and glutamate at hippocampal CA1 synaptic terminals. *Neuroscience.* 192:28-36
175. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 267(22):15274-15276
176. Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Takeda K, Sugai M, Kinane DF, Kurihara H. (2003) Macrophage inflammatory protein-3alpha and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 306(4):867-871
177. Shyng SL, Sha Q, Ferrigni T, Lopatin AN, Nichols CG. (1996) Depletion of intracellular polyamines relieves inward rectification of potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(21):12014-12019
178. Siepmann M, Barth J, Kirch W. (1994) Sicca-Symptomatik unter systemischer Therapie mit beta-Rezeptorenblockern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 119 (51-52):1783–1785
179. Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER. (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell.* 87(6):1015-1023
180. Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T(2005) Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol.* 174(8):4870-4879
181. Sperandeo MP, Borsani G, Incerti B, Zollo M, Rossi E, Zuffardi O. et al. (1998) The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics* 49(2): 230–236
182. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. (2010) Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.* (4):435-452

183. Stevens BR, Vo CB. (1998) Membrane transport of neuronal nitric oxide synthase substrate L-arginine is constitutively expressed with CAT1 and 4F2hc, but not CAT2 or rBAT. *J Neurochem.* 71(2):564-570
184. Stuehr DJ, Nathan CF. (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med.* 169(5):1543-1555
185. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(17):7773-7777
186. Tabor CW, Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53:749-790
187. Tan CH, Ng FH. (1995) High and low affinity transport of L-arginine in rat brain synaptosomes. *Experientia.* 51(11):1052-1054
188. Thomas T, Thomas TJ. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.* 58(2):244-258
189. Tiffany JM. (1986) Refractive index of meibomian and other lipids. *Curr Eye Res.* 5(11):887-889
190. Uzar E, Evliyaoglu O, Toprak G, Acar A, Yucel Y, Calisir T, Cevik MU, Tasdemir N. (2011) Increased asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in patients with migraine. *J Headache Pain* 12(2):239-243
191. Uzbay T. (2012) A new target for diagnosis and treatment of CNS disorders: agmatinergic system. *Curr Med Chem.* 19(30):5116-5121
192. Uzbay T, Kose A, Kayir H, Ulusoy G, Celik T. (2010) Sex-related effects of agmatine on caffeine-induced locomotor activity in Swiss Webster mice. *Eur J Pharmacol.* 630(1-3):69-73
193. Uzbay IT, Yeşilyurt O, Celik T, Ergün H, İşimer A. (2000) Effects of agmatine on ethanol withdrawal syndrome in rats. *Behav Brain Res.* 107(1-2):153-159
194. Van Winkle LJ, Christensen HN, Campione AL. (1985) Na<sup>+</sup>-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem.* 260(22):12118-12123
195. Vekony N, Wolf S, Boissel JP, Gnauert K, Closs EI. (2001) Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissue. *Biochem.* 40:12387-12394
196. Vivó M, de Vera N, Cortés R, Mengod G, Camón L, Martínez E. (2001) Polyamines in the basal ganglia of human brain. Influence of aging and degenerative movement disorders. *Neurosci Lett.* 304(1-2):107-111
197. Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D. (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature.* 352(6337):729-731
198. Wang XF, Wu N, Su RB, Lu XQ, Liu Y, Li J. (2011) Agmatine modulates neuroadaptations of glutamate transmission in the nucleus accumbens of repeated morphine-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 650(1):200-205
199. Waxman EA, Lynch DR. (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist.* 11(1):37-49

200. Weiss SW, Albers DS, Iadarola MJ, Dawson TM, Dawson VL, Standaert DG. (1998) NMDAR1 glutamate receptor subunit isoforms in neostriatal, neocortical, and hippocampal nitric oxide synthase neurons. *J Neurosci.* 18(5):1725-1734
201. Wellner K, Fiedler G, Wohlrab W. (1992) Untersuchungen zum Harnstoffgehalt der Hornschicht bei Neurodermitis. *Z Hautkr.* 67:648-650
202. Westergaard N, Beart PM, Schousboe A. (1993) Transport of L-[3H] arginine in cultured neurons: characteristics and inhibition by nitric oxide synthase inhibitors. *J Neurochem.* 61(1):364-367
203. Wiesinger H. (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 64:365-391
204. Williams DL, Pierce V, Mellor P, Heath MF. (2007) Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *J Small Anim Prac.* 48(5):252-256
205. Williams K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 325(2):289-297
206. Wolf S, Janzen A, Vékony N, Martiné U, Strand D, Closs EI. (2002) Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem. J.* 364 (3):767-775
207. Wong J, Lan W, Ong LM, Tong L. (2011) Non-hormonal systemic medications and dry eye. *Ocul Surf.* 9(4):212-226
208. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 256(5054):225-228
209. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific  $\beta$ -Defensin isoforms in human and mice. *J Immunol.* 169:2516-2523
210. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 3(6):291-296
211. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 286(5439):525-528
212. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J. et al. (2006) Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J. Immunol.* 176 (10), S. 5918-5924
213. Zaniewska M, McCreary AC, Sezer G, Przegaliński E, Filip M. (2008) Effects of agmatine on nicotine-evoked behavioral responses in rats. *Pharmacol Rep.* 60(5):645-654
214. Zengin N, Tol H, Balevi S, Gündüz K, Okudan S, Endoğru H. (1996) Tear film and meibomian gland functions in psoriasis. *Acta Ophthalmol Scand* 74(4):358-360
215. Zhu MY, Wang WP, Bissette G. (2006) Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience.* 141(4):2019-2027



## **LITERATURVERZEICHNIS**

---

216. Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. (2002) Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*. 13(4):387-391
217. Zomkowski AD, Santos AR, Rodrigues AL. (2005) Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett*. 381(3):279-283

### **ANHANG**

#### **LEBENS LAUF DR. RER. NAT. KRISTIN JÄGER, GEB. RECKER**

##### **PERSÖNLICHE ANGABEN**

Name	Jäger, geb. Recker
Vorname	Kristin
Geburtsdatum	20.04.1977
Geburtsort	Halle/Saale
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Kinder	Ben Jäger (21.03.2007)

##### **STUDIUM**

10.1995 bis 07.2000      Studium der Biologie an der MLU Halle-Wittenberg  
Hauptfach:    Genetik  
Nebenfächer    Mikrobiologie, Biochemie, Immunologie

10.1999 bis 07.2000      Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und  
Medizinische Biologie bei Prof. Dr. I. Hansmann  
Thema: „Identifizierung und Charakterisierung eines in  
ES-Zellen der Maus durch gene trap markierten Gens  
des Retinsäure Signalwegs“  
Abschluss: Diplom (gut)

##### **PRAKTIKUM**

09.2000 bis 02.2001      Max-Planck Institut für evolutionäre Anthropologie,  
Leipzig bei Prof. Dr. S. Pääbo

##### **DISSERTATION**

03.2001 bis 03.2004      Promotion zum Dr. rer. nat. an der MLU Halle-  
Wittenberg, in der Klinik für Dermatologie und  
Venerologie bei Prof. Dr. J. Wohlrab, Thema:  
“Expression und Regulation des  $\gamma^+$ -Transporters in  
kutanen Zellen“.  
Abschluss: (Sehr gut)

**BESCHÄFTIGUNG**

04.2004                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Paulsen

**ELTERNZEIT**

01.2007 bis 09.2008                      Elternzeit

**WEITERBESCHÄFTIGUNG**

10.2008                      Fortführung der wissenschaftlichen Mitarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der MLU Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Paulsen

03.2011                      Laborleiterin der Gruppe „Metabolisierung und Transport von L-Arginin“ am Institut für Anatomie und Zellbiologie an der MLU Halle-Wittenberg in der AG von Prof. Dr. Heike Kielstein

**ABSCHLUSS**

09.2010                      Anerkennung zum Fachanatom

Dr. Kristin Jäger

Halle,

**ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe zu keinem Zeitpunkt an einer anderen Universität, als der MLU-Halle-Wittenberg, ein Habilitationsverfahren eröffnet. Es wurde somit auch an keiner anderen Universität, ein von mir gestelltes Habilitationsgesuch, abgelehnt.

Halle,

Kristin Jäger

### **DANKSAGUNG**

Mit dieser Danksagung möchte ich mich bei all' denen bedanken, die mich direkt oder indirekt während meiner Zeit der Habilitationsarbeit unterstützt haben und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Falls ich jemanden namentlich nicht erwähnt habe, möchte ich dem/derjenigen hiermit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Im Besonderen möchte ich Herrn Prof. Fischer danken, an dessen Lehrstuhl diese Arbeit entstanden ist, für seine Unterstützung und sein großes Interesse.

Mein großer Dank gilt vor allem Prof. Friedrich Paulsen, der mich von Anfang an als Mentor begleitete und mich in vielerlei Hinsicht, auch nach seinem Ruf nach Erlangen, förderte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Bernstein bedanken, der mich besonders im letzten Drittel der Arbeit unterstützt hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch an seine fleißigen Technischen Assistentinnen ein großes Dankeschön.

Frau Prof. Kielstein danke ich herzlichst, dass sie es mir ermöglicht hat meine Arbeit fortzuführen und zu beenden.

Prof. Lars Bräuer möchte ich für seine freundschaftlichen und fachlichen Anregungen danken.

Prof. Faramarz Dehghani und Prof. Erik Maronde danke ich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und ihre fachliche Unterstützung.

Allen TA's, Diplomanden und Doktoranden der Arbeitsgruppe und der halleschen Anatomie (im Besonderen dem Präparatorenteam Jana Gräfenhain und Achim Heine), gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Dem Wilhelm Roux-Programm, der Dr. Mann Pharma/Bausch und Lomb und dem Berufsverband der Augenärzte danke ich für die finanziellen Unterstützungen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Sohn und meinem Mann, aus derer Liebe ich stetig neue Kraft schöpfen konnte.

**THEMA RELEVANTE EIGENE PUBLIKATIONEN**

**Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased ocular surface.**

Jäger K, Bönisch U, Risch M, Worlitzsch D, Paulsen F. (2009)

Invest Ophthalmol Vis Sci. 50(3):1112-21

doi: 10.1167/iovs.08-2368

<http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-2368>

**Abstract**

**PURPOSE:** To evaluate the presence and role of human cationic amino acid transporters (hCATs) at the ocular surface in healthy and pathologic states and under experimental inflammatory conditions.

**METHODS:** Expression of mRNA for hCATs 1, 2, and 3 (SLC7A1, SLC7A2, and SLC7A3) was analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in healthy lacrimal gland, conjunctiva, cornea, and nasolacrimal ducts and in an SV40 immortalized human corneal epithelial (HCE) cell line. Localization of hCAT1 and hCAT2 was determined by immunohistochemistry in healthy tissues and in sections of different corneal abnormalities, including keratoconus, Fuchs dystrophy, and herpetic keratitis. Cultured corneal epithelial cells were stimulated with proinflammatory cytokines and supernatants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and were analyzed by real-time PCR.

**RESULTS:** Expression of hCAT1 and hCAT2 mRNA, but not of hCAT3 mRNA, was detected in healthy conjunctiva, cornea, and nasolacrimal ducts. Human lacrimal gland revealed only hCAT2 mRNA expression. Immunohistochemistry demonstrated the presence of hCAT1 and hCAT2 in epithelial cells of cornea, conjunctiva, and nasolacrimal ducts. Goblet cells revealed no reactivity. Moreover, hCAT2 was visible in acinar cells of lacrimal gland. No changes in staining reactivity were obtained for hCAT1 in different corneal abnormalities. In contrast, hCAT2 showed increased subjective staining intensity in all corneal abnormalities. Cell culture experiments revealed that TNF- $\alpha$  and supernatant of *S. aureus* increased hCAT1 and hCAT2 expression significantly. Supernatant of *P. aeruginosa* led to an increase in hCAT2-expression only.

**CONCLUSIONS:** These results show for the first time the distribution of hCATs in tissues of the ocular surface and lacrimal apparatus. Both transporters seem to be differently regulated under pathologic conditions of the ocular surface. Their physiological functions in amino acid transport make them potential candidates for therapeutic intervention.

**Roles of human beta-defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells.**

Garreis F, Schlorf T, Worlitzsch D, Steven P, Bräuer L, Jäger K, Paulsen FP. (2010)

Histochem Cell Biol. 134(1):59-73

doi: 10.1007/s00418-010-0713-y

<http://dx.doi.org/10.1007/s00418-010-0713-y>

**Abstract**

Human beta-defensins are cationic peptides produced by epithelial cells that have been proposed to be an important component of immune function at mucosal surfaces. In this study, the expression and inducibility of beta-defensins at the ocular surface were investigated in vitro and in vivo. Expression of human beta-defensins (hBD) was determined by RT-PCR and immunohistochemistry in tissues of the ocular surface and lacrimal apparatus. Cultured corneal and conjunctival epithelial cells were stimulated with proinflammatory cytokines and supernatants of different ocular pathogens. Real-time PCR and ELISA experiments were performed to study the effect on the inducibility of hBD2 and 3. Expression and inducibility of mouse beta-defensins-2, -3 and -4 (mBD2-4) were tested in a mouse ocular surface scratch model with and without treatment of supernatants of a clinical *Staphylococcus aureus* (SA) isolate by means of immunohistochemistry. Here we show that hBD1, -2, -3 and -4 are constitutively expressed in conjunctival epithelial cells and also partly in cornea. Healthy tissues of the ocular surface, lacrimal apparatus and human tears contain measurable amounts of hBD2 and -3, with highest concentrations in cornea and much lower concentrations in all other tissues, especially tears, suggesting intraepithelial storage of beta-defensins. Exposure of cultured human corneal and conjunctival epithelial cells to proinflammatory cytokines and supernatants of various bacteria revealed that IL-1beta is a very strong inducer of hBD2 and *Staphylococcus aureus* increases both hBD2 and hBD3 production in corneal and conjunctival epithelial cells. A murine corneal scratch model demonstrated that beta-defensins are only induced if microbial products within the tear film come into contact with a defective epithelium. Our finding suggests that the tear film per se contains so much antimicrobial substances that epithelial induction of beta-defensins occurs only as a result of ocular surface damage. These findings widen our knowledge of the distribution, amount and inducibility of beta-defensins at the ocular surface and lacrimal apparatus and show how beta-defensins are regulated specifically.

**In vitro evidence of involvement of the epithelial  $\gamma^+$  transporter in  $\beta$ -defensin production on the ocular surface.**

Jäger K, Nielitz A, Garreis F, Sel S, Nave H, Paulsen FP. (2011)

Ann Anat. 193(6):479-85

doi: 10.1016/j.aanat.2011.10.001

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2011.10.001>

**Abstract**

To analyse the hypothesis as to whether there is a functional relationship between human cationic amino acid transporters (hCATs,  $\gamma^+$  transporter, the main transporter of L-arginine and L-lysine) and human  $\beta$ -defensin (important components of immune function) production on the ocular surface, arginase and nitrate monoxide synthase (NOS), enzymes that compete for L-arginine, were inhibited by norNOHA (N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine) and/or L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester) in cultured human corneal epithelial cells. In addition, the transport activity of hCAT proteins was inhibited or activated through  $\alpha$ -tocopherol or PMA (phorbol myristate acetate), respectively. Concentrations of the human inducible  $\beta$ -defensins (hBD) 2 and 3 were determined by ELISA experiments. The basic expression of hBD3 in non-stimulated HCE cells significantly exceeded that of hBD2. Both  $\beta$ -defensins also differed as to how readily their excretion could be stimulated. HBD2 excretion rate was 3.5 time more by L-NAME, whereas norNOHA had no effect. In contrast, hBD3 excretion was increased by norNOHA by a factor of 1.5 but L-NAME alone had no effect. The excretion of both  $\beta$ -defensins was increased 3- and 6-fold by combined administration of L-NAME, norNOHA and interleukin (IL)-1 $\beta$ . Administration of  $\alpha$ -tocopherol increased hBD2 excretion twofold. No effect was observed for hBD3. With PMA, on the other hand, a reduction in secretion for both  $\beta$ -defensins was observed. These in vitro findings provide evidence of a functional association between CAT proteins and  $\beta$ -defensins 2 and 3 opening up a new field of research with pharmacological perspectives for treatment of inflammatory diseases such as keratitis or dry eye disease.



**Functional relationship between cationic amino acid transporters and beta-defensins:  
implications for dry skin diseases and the dry eye.**

Jäger K, Garreis F, Posa A, Dunse M, Paulsen FP. (2010)

Ann Anat. 192(2):65-9

doi: 10.1016/j.aanat.2010.01.006

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2010.01.006>

**Abstract**

The ocular surface, constantly exposed to environmental pathogens, is particularly vulnerable to infection. Hence an advanced immune defence system is essential to protect the eye from microbial attack. Antimicrobial peptides, such as beta-defensins, are essential components of the innate immune system and are the first line of defence against invaders of the eye. High concentrations of L-arginine and L-lysine are necessary for the expression of beta-defensins. These are supplied by epithelial cells in inflammatory processes. The limiting factor for initiation of beta-defensin production is the transport of L-arginine and L-lysine into the cell. This transport is performed to 80% by only one transporter system in the human, the  $\gamma(+)$ -transporter. This group of proteins exclusively transports the cationic amino acids L-arginine, L-lysine and L-ornithine and is also known under the term cationic amino acid transporter proteins (CAT-proteins). Various infections associated with L-arginine deficiency (for example psoriasis, keratoconjunctivitis sicca) are also associated with an increase in beta-defensin production. For the first time, preliminary work has shown the expression of human CATs in ocular surface epithelia and tissues of the lacrimal apparatus indicating their relevance for diseases of the ocular surface. In this review, we summarize current knowledge on the human CATs that appear to be integrated in causal regulation cascades of beta-defensins, thereby offering novel concepts for therapeutic perspectives.

**Enzymes of urea synthesis are expressed at the ocular surface, and decreased urea in the tear fluid is associated with dry-eye syndrome.**

Jäger K, Kielstein H, Dunse M, Nass N, Paulsen F, Sel S. (2013)

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.

**Abstract**

**PURPOSE:** The present study aims at determining whether enzymes of urea synthesis are expressed in the human lacrimal gland and in tissues of ocular surface (conjunctiva, cornea), to give evidence for the hypothesis that urea can be locally formed from ocular tissues and is important for the composition of the tear fluid.

**METHODS:** The presences of enzymes (arginase 1, 2 and agmatinase) that directly contribute to the formation of urea were investigated in the lacrimal gland and tissues of ocular surface by RT-PCR and immunohistochemistry. We collected tear fluid, aqueous humour, and blood samples from a total of 38 subjects, and tear fluid samples from a total of 78 subjects, with and without dry-eye syndrome (DES, keratoconjunctivitis sicca), and determined the urea concentration.

**RESULTS:** The enzymes arginase 1, 2 and agmatinase were expressed in all tissues examined except for arginase 1, which was not expressed in the cornea. There was no correlation of urea concentration in tear fluid with aqueous humour and blood plasma ( $r=0.13$ ,  $p=0.58$  and  $r=0.45$ ,  $p=0.05$  respectively). However, correlation of urea concentration between aqueous humour and blood plasma was highly significant ( $r=0.7$ ,  $p=0.0001$ ). The concentration of urea in the tear fluid of patients with DES compared to healthy control group was significantly reduced ( $p < 0.0001$ ).

**CONCLUSION:** Enzymes that are directly involved in the formation of urea are expressed in ocular tissues. This may imply that in the ocular surface is a well-coordinated system of enzymes that can produce urea which might be independent of external urea supply.

**Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders.**

Bernstein HG, Stich C, Jäger K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G. (2012)

Neuropharmacology. 62(1):237-46

doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.012

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.012>

**Abstract**

The diamine agmatine may serve as a precursor in polyamine synthesis. In addition, agmatine may also act as a neurotransmitter, binding to imidazoline receptors. Behaviorally, agmatine exerts antidepressant-like effects. The enzyme agmatinase degrades agmatine. The gene coding for human agmatinase is located on chromosome 1p36, a gene locus which has been linked to bipolar disorder and major depression, but the enzyme has not yet been studied in the context of neuropsychiatric diseases. We analyzed agmatinase protein expression in postmortem hippocampi of individuals with affective disorders. Data from eleven patients with mood disorders (unipolar and bipolar depression) and twelve matched control cases were compared by immunocytochemical and morphometrical analysis. Agmatinase protein was detected in a subset of hippocampal interneurons. The protein was localized to perikarya, neurites and putative nerve endings contacting hippocampal pyramidal neurons and dentate gyrus granule cells. The number and the numerical density of agmatinase-immunopositive cell bodies were strongly elevated in depressive patients. In addition, a significantly increased density of agmatinase-immunoreactive punctate profiles was observed in the CA(4) region in unipolar and bipolar depression. The reported increased expression of agmatinase suggests a functional relevance of the enzyme in the pathophysiology of human affective disorders. This article is part of a Special Issue entitled 'Anxiety and Depression'.

**Differential topochemistry of three cationic amino acid transporter proteins, hCAT1, hCAT2 and hCAT3, in the adult human brain.**

Jäger K, Wolf S, Dobrowolny H, Steiner J, Nave H, Maronde E, Bogerts B, Bernstein HG. (2013)

Amino Acids. 44(2):423-33

doi: 10.1007/s00726-012-1348-1

<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-012-1348-1>

**Abstract**

The cellular uptake of L-arginine and other cationic amino acids (such as L-lysine and L-ornithine) is mainly mediated by cationic amino acid transporter (CAT) proteins. Despite the important roles of cationic amino acid transporters for normal brain functioning and various brain diseases there is currently only fragmentary knowledge about their cellular and regional distribution patterns in the human brain. We mapped the immunohistochemical localization of human cationic amino acid transporters 1, 2 and 3 (hCAT1, 2, and 3) throughout five adult human brains and found a wide but uneven distribution of these transporters. All three hCAT1s were mainly localized in neurons, but were also found in numerous astrocytes, oligodendrocytes, plexus choroideus epithelial cells, and small blood vessels. The highest density of hCAT expressing neurons was observed in the hypothalamus, in some areas of the cerebral cortex, the thalamic reticular nucleus and the caudate nucleus, whereas weak to moderate expression was detected in the hippocampus, the prefrontal cortex (hCAT1 only), pons, brain stem and cerebellum. In contrast to what has been found in rodent brain, we detected hCAT2 and hCAT3 also in astrocytes. Overall, each hCAT has its characteristic, individual cerebral expression patterns, which, however, overlap with the others.