

Der epidermale Arginin-Stoffwechsel und dessen therapeutische Beeinflussung

The Epidermal Arginine Metabolism and Its Therapeutical Influence

Zusammenfassung

Arginin ist als physiologische Aminosäure für die topische Anwendung in kosmetischer und dermatologischer Hinsicht eine vielversprechende Wirksubstanz. Arginin wird enzymatisch in der Arginasereaktion zu Harnstoff und Ornithin sowie in der NO-Synthase-Reaktion zu NO und Citrullin metabolisiert. Harnstoff erhöht die Wasserbindungskapazität der Hornschicht, besitzt keratoplastische, bakteriostatische, antimykotische, juckreizstillende und proteolytische Eigenschaften. NO ist wesentlich an der Regulation der hämo- und lymphovaskulären Perfusion sowie Initiation und Unterhaltung von Entzündungsprozessen beteiligt und verfügt über immunmodulierende und Radikalfängereigenschaften. Sowohl Arginase als auch NO-Synthase werden in Keratinozyten, aber auch in weiteren kutanen Zellen (z. B. Melanozyten, Fibroblasten, mikrovaskuläre Endothelzellen) exprimiert und funktionell durch verschiedene Faktoren in ihrer Aktivität beeinflusst. Arginin ist aus toxikologischer Sicht in relevanten Konzentrationen als unbedenklich einzustufen. Als hydrophile Substanz lässt sich L-Arginin unkompliziert in Standardvehikelsysteme zur topischen Applikation einarbeiten. L-Arginin penetriert in die menschliche Haut, wobei in der lebenden Epidermis ein ausreichendes Konzentrations-Zeit-Profil erreicht wird. Die Potenz einer praktischen Anwendung von topisch appliziertem L-Arginin ergibt sich aus der biochemischen Stellung des Arginins im epidermalen Stoffwechsel. Neben der kosmetischen Anwendung und der Pflgetherapie bei chronischen Dermatosen ist eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten bei Störungen der Funktion und Struktur der Haut möglich.

Abstract

From a cosmetic and dermatological point of view, arginine, a physiological amino acid, is a promising active substance for topical applications. Arginine is metabolized enzymatically in the arginase reaction to urea and ornithine and in the NO-synthase reaction to NO and citrullin. Urea increases the water binding capacity of the horny skin layer, possesses keratoplastic, bacteriostatic, antimycotic, and proteolytic properties and relieves itching. NO is essentially involved in the regulation of hemo- and lymphovascular perfusion and in initiation and maintenance of inflammatory processes. It possesses immunomodulating and radical trapping properties. Both arginase and NO synthase are expressed in keratinocytes, and also in other cutaneous cells (such as melanocytes, fibroblasts, microvascular endothelial cells) and its activity is functionally influenced by various factors. In relevant concentrations, arginine can be considered safe from a toxicological point of view. As a hydrophilic substance, L-arginine can be easily worked into standard vehicle systems for topical application. L-arginine penetrates into human skin, whereby an adequate concentration time-profile is attained in the living epidermis. The potency of practical use of topically applied L-arginine arises from the biochemical role of arginine in epidermal metabolism. In addition to cosmetic use and therapy of chronic dermatoses, a number of additional applications are possible in functional and structural disruptions of the skin.

Institutsangaben

Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Korrespondenzadresse

Dr. med. habil. J. Wohlrab, Privatdozent · Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg · Ernst-Kromayer-Str. 5 – 6 · 06097 Halle/S. · Germany · E-mail: johannes.wohlab@medizin.uni-halle.de

Bibliografie

Akt Dermatol 2002; 28: 13–20 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0340-2541

Einleitung

Die Aminosäure Arginin ist aus kosmetischer und dermatologischer Sicht eine vielversprechende Wirksubstanz im Hinblick auf die topische Anwendung. Die Potenz der Substanz lässt sich auf die komplexe metabolische Einbindung des Arginins in den Zellstoffwechsel und die günstigen physikochemischen Eigenschaften zurückführen [10,11]. Von besonderem Interesse sind dabei spezifische und unspezifische Wechselwirkungen des Arginins mit Keratinozyten. Arginin kann enzymatisch durch Arginase zu Harnstoff metabolisiert werden [11]. Harnstoff erhöht die Wasserbindungskapazität der Epidermis und trägt somit entscheidend zur Barrierefunktion des Epithels bei [31]. Darüber hinaus dient Arginin als Substrat für die enzymatische Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) über die NO-Synthase. NO ist wesentlich an der Regulation der hämo- und lymphovaskulären Perfusion sowie der Initiation und Unterhaltung von Entzündungsprozessen beteiligt [11].

Über die Möglichkeit der topischen Anwendung von Arginin sind bisher wenige Daten publiziert. Von besonderem Interesse ist dabei die Klärung der Interaktionen des Wirkstoffs mit der Epidermis, die Objektivierung der Penetrationsdynamik und -kinetik sowie die Untersuchung der Haut- und Schleimhauttoxizität und der klinischen Wirksamkeit als Voraussetzung für den kosmetischen und prophylaktischen Einsatz in Dermatika.

Chemie des Arginins

Wie bei allen Aminosäuren besteht die Basisstruktur von Arginin (2-Amino-5-guanidovaleriansäure) aus einer Aminogruppe (NH_2), einer Carboxylgruppe (COOH) und einem am 2. Kohlenstoffatom gebundenen Wasserstoffatom [11]. Arginin zählt zusammen mit Lysin und Histidin zur Gruppe der Diaminomonocarbonsäuren und trägt eine zusätzliche basische Gruppe in der Seitenkette (Abb. 1).

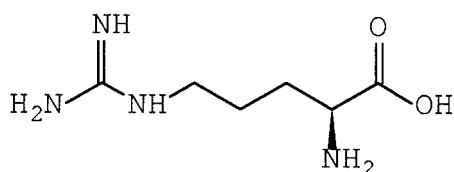


Abb. 1 Strukturformel von Arginin ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$; MG 174,2).

Arginin löst sich leicht im Wasser. Der Schmelzpunkt liegt bei 238°C und die spezifische Drehung bei 20°C im Natriumlicht beträgt $27,4^\circ$. Bei Zimmertemperatur liegt Arginin als weißes kristallines Pulver vor [11]. Arginin befindet sich physiologisch in der optischen L-Konfiguration, zählt zu den glukoplastischen, nicht-essenziellen Aminosäuren und kann somit vom Menschen endogen synthetisiert werden. Gleichwohl ist bekannt, dass bei extremen Verhältnissen (z.B. Schock, Sepsis, Wachstum) die endogene Synthese einiger nichtessenzieller Aminosäuren, so auch Arginin, aufgrund eines Stickstoffdefizits nicht ausreichend sein kann. Deshalb spricht man auch von „bedingt essenziellen“ Aminosäuren.

Arginin und seine biochemische Bedeutung

Arginin wurde erstmals von Schulze und Steiger 1866 in kristalliner Form isoliert. Etwa 10 Jahre später konnte das Vorkommen in tierischem Gewebe nachgewiesen werden. Es wurde erkannt, dass Arginin eine wesentliche Bedeutung im Zusammenhang mit Wachstumsvorgängen und bei der Regulation des Stickstoffmetabolismus hat. Arginin wird intrazellulär durch Proteolyse und im Harnstoffzyklus aus Argininsuccinat in der Argininsuccinase-Reaktion synthetisiert. Arginin ist ein essenzieller Cofaktor für die Pyrimidinsynthese [10] und dient als Precursor der Polyaminsynthese (Spermin, Spermidin) [26]. Darüber hinaus kann L-Arginin die Freisetzung von verschiedenen Hormonen, insbesondere Pankreashormonen, bedingen [6].

L-Arginin ist neben der Protein- und der Kreatinsynthese das Substrat zweier bedeutsamer enzymatischer Reaktionen (Abb. 2):

A. Arginase-Reaktion [14]

Das Enzym Arginase setzt L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin um. L-Ornithin wiederum kann durch die Ornithincarbamoyltransferase im Harnstoffzyklus zu L-Citrullin metabolisiert werden oder steht für die Polyaminsynthese zur Verfügung.

B. Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase-Reaktion [7,11,16,19]

Hierbei wird aus L-Arginin, katalytisch durch NO-Synthase gesteuert, NO und L-Citrullin synthetisiert. L-Citrullin ist ein Substrat für den Citrat- und den Harnstoff-Zyklus.

Von besonderem Interesse sind die Wechselwirkungen der NO-Synthase mit der Arginase (A2). Fest steht, dass beide Enzyme um das Substrat L-Arginin physiologisch konkurrieren und sich somit zwangsläufig beeinflussen. Die Arbeitsgruppe um L. J. Ignarro [4] beschrieb die Substratabhängigkeit beider Enzyme. Durch Applikation von N^G -hydroxy-L-Arginin (NOHA), einem potenten Inhibitor der Arginase, konnte die NO-Produktion durch Aktivierung der iNOS deutlich gesteigert und die Harnstoffsynthese vermindert werden. Umgekehrt zeigte sich bei Applikation von N^G -methyl-L-Arginin, einem selektiven Blocker der iNOS, eine Steigerung der Harnstoff- und eine Senkung der NO-Synthase. Gotoh et al. [8] berichteten über eine Hemmung der NO-Synthase durch Arginase (A2), konnten aber auf mRNA-Ebene keine gewebeeinheitlichen Effekte nachweisen. Sie fanden in verschiedenen extrahepatischen Organen eine unterschiedlich starke Expression der Arginase (A2) und postulierten gewebe- und alterspezifische Regulationsabläufe, die wesentlich von der Stärke der Expression der Arginase (A2) abhängen. Vergleichend zu venösen Ulcera crurum untersuchten Abd El Aleem et al. [1] die Aktivität der Arginase und der NOS an gesunder Haut. Sie stellten fest, dass die Aktivität beider Enzyme in den Ulzera vermindert war und schlussfolgerten einen ursächlichen Zusammenhang, der die Wundheilungsstörung bedingt. Dies wird durch die Untersuchungen von Jude et al. [15] aus derselben Arbeitsgruppe um Ferguson unterstützt, die ebenfalls eine Aktivitätsminderung beider Enzyme bei diabetischen Fußulzera fanden. Sie vermuteten darüber hinaus einen Zusammenhang mit einer lokal erhöhten TGF- β 1-Konzentration. Louis et al. [18] wiesen auf mRNA-Ebene eine vermehrte Expression unter Hyperoxie und eine Suppression der Expression unter Hypoxie nach. Den Einfluss von Lipopolysacchariden (LPS) auf die Genregulation der Arginase-Iso-

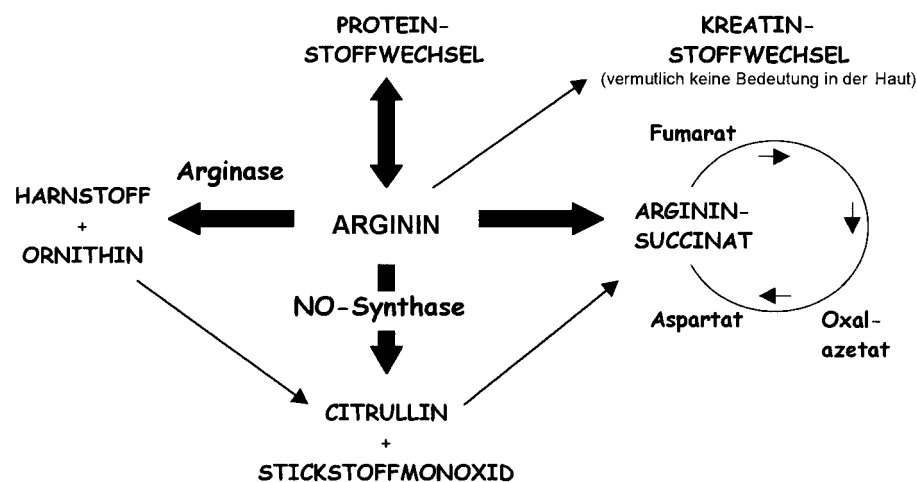


Abb. 2 Schematische Darstellung des keratinozytären L-Arginin-Stoffwechsels (nach [11]).

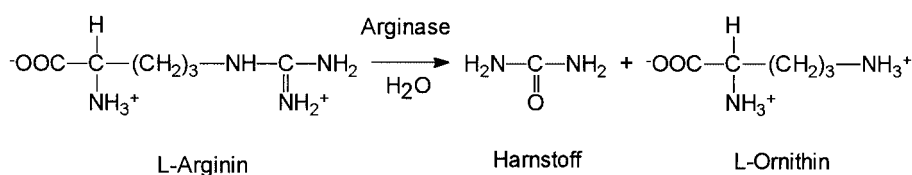


Abb. 3 Arginase-Reaktion (nach [11]).

formen und iNOS untersuchten Salimuddin et al. [24]. Sie wiesen eine zeitliche Differenz der Aktivierung der Arginase-Isoformen nach und schlussfolgerten einen Zusammenhang der Arginase-Regulation mit der NO-Synthese.

L-Arginin kommt eine Schlüsselfunktion bei der Bildung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barrierefunktion zu. Es dient als eine wichtige Harnstoffquelle für die Epidermis und bestimmt somit indirekt entscheidend die Hydratation des Stratum corneum. In der gleichen enzymatischen Reaktion wird L-Ornithin als Precursor der Polyaminsynthese gebildet. Polyamine sind niedermolekulare Substanzen (z.B. Spermidin, Spermin), die in nahezu allen humanen Zellen nachweisbar sind. Ihnen wird eine zentrale Rolle bei der Stimulation der Zellproliferation, dem Gewebewachstum und der Differenzierung zugeschrieben [26].

L-Arginin trägt weiterhin durch die Generierung von NO zur Regulation des hämo- und lymphovaskulären Systems bei [3,16]. Es ermöglicht die bedarfsgerechte Verteilung und das Recycling von Blutgasen, Nährstoffen und Flüssigkeit. NO verfügt darüber hinaus über eine Vielzahl weiterer Wirkungen, deren physiologisches und pathophysiologisches Zusammenspiel noch nicht vollständig geklärt ist.

Die biochemische Bedeutung von L-Arginin reicht über die beschriebenen Hauptreaktionen hinaus. L-Arginin reguliert über die Pyrimidinsynthese die Bildung von Pyrimidinnukleotiden, die essenziell für die DNA- und RNA-Synthese sind [10]. Des Weiteren besitzt L-Arginin eine direkte oder indirekte Wirkung auf die Freisetzung von Hormonen. So haben Dupré et al. [6] eine insulinstimulierende Wirkung, Merimée et al. [21] den Einfluss auf die Freisetzung von hypophysären Hormonen und Imms et al. [12] den Anstieg von Katecholaminen nach L-Argininstimulation beschrieben.

Arginin im Harnstoffzyklus (Arginase-Reaktion)

Im Harnstoffzyklus von Hepatozyten wird L-Arginin (2-Amino-5-guanidovaleriansäure) durch das L-Isomer-spezifische Enzym Arginase (A1, Typ I) zu L-Ornithin und Harnstoff hydrolytisch gespalten (Abb. 3).

Neben der Arginase Typ I (A1), der so genannten hepatischen oder konstitutiven Form (MG 38,9 kDa) ist eine zweite Isoform, der Typ II (A2), die extrahepatische oder die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierbare Form (MG 39,8 kDa) bekannt [8–9,14]. Die ersten Berichte über eine epidermale Arginase stammen von Roberts und Fränkel (1949). Rothberg (1958) untersuchte die epidermale Arginase mit manometrischen Methoden und stellte fest, dass das Enzym weitgehend an hochmolekulare Substanzen gebunden ist und nur zu einem geringen Teil in gelöster Form vorliegt.

Intraepidermal wird Harnstoff durch Keratinozyten aus L-Arginin neosynthetisiert. Diese exprimieren die L-isomerspezifische Arginase (AII, Typ II) in Mitochondrien. Die Hydrolase ist spezifisch und besitzt eine hohe Aktivität. Sie liegt weitgehend als Desmoenzym vor und ist somit an hochmolekulare unlösliche Träger gebunden. Im Vergleich zu anderen Organen und Kompartimenten enthält die Epidermis den größten prozentualen Anteil an Arginase. Die extrahepatische Isoform der Arginase unterscheidet sich von der hepatischen Isoform durch einen nahezu neutralen pI-Wert und durch ein etwas höheres Molekulargewicht. Die tetramere keratinozytäre Arginase ist ein Metalloenzym und bindet als Cofaktor Mn^{2+} -Ionen, die das Molekül stabilisieren und die Aktivität regulieren. Kristallographische Untersuchungen haben deutlich gemacht, dass das Manganzentrum im Arginasemolekül aus zwei aufeinander abgestimmten Mn^{2+} -Ionen (MnA und MnB) aufgebaut ist. Diese werden durch Wassermoleküle und zwei Aspartatreste miteinander verbunden. Ein

Fehlen der Metallionen bewirkt eine Dissoziation des Enzyms in vier inaktive Monomere. Hingegen führt der Zusatz von Mn^{2+} -Ionen zur Steigerung der enzymatischen Aktivität. Das pH-Optimum liegt in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen bei pH 10 [14]. Ab einem pH von ≤ 6 dissoziiert das Tetramer reversibel über Dimere zu inaktiven Monomeren. Der K_m -Wert beider Isoenzyme beträgt für L-Arginin 12–14 mM [14].

Die essenzielle Bedeutung der Arginase (A2) für den Menschen wiesen Mendez et al. [20] nach, die durch die selektive Blockade der uterinen Arginase mit 2-Amino-5-Iodoacetamidvaleriansäure (AIAVA) bei trächtigen Ratten eine erhebliche intrauterine Entwicklungsretardierung der Embryonen feststellten und Chamorro et al. [5], die bei Blockade der Arginase (A2) mit (+)-S-2-Amino-6-Iodoacetamidohexansäure (2-AIHA) über einen Fertilitätsverlust und Neoplasien berichteten.

Darüber hinaus beschrieb Ratner [23], dass Carbomylphosphat, welches im Rahmen der Pyrimidinsynthese durch Carbomylphosphatsynthase I (CPSI) produziert wird, für die Harnstoffsynthese in der Leber von Bedeutung ist. Ob dieser für die Arginase (A1) beschriebene Effekt auch für die Arginase (A2) von Bedeutung ist, bleibt unklar.

Durch Inkubation von Keratinozytenkulturen (HaCaT und native Keratinozyten) mit unterschiedlichen Konzentrationen von L-Arginin konnten wir im Westernblot keine vermehrte Expression des Arginase-Proteins feststellen [29]. Bekannt ist aber, dass beispielsweise hormonelle Faktoren eine Expression der Arginase (A2) bedingen können. Jenkinson et al. [14] konnten nachweisen, dass während der Laktation die Aktivität der mammären Arginase um den Faktor drei steigt, und mit Westernblot-Technik zeigen, dass dies durch eine de-novo-Protein-Synthese der Arginase (A2) zu erklären ist. Weiterhin ist bekannt, dass die Regulation der Aktivität der extrahepatischen Arginase wesentlich über die intrazelluläre Konzentration von L-Arginin gesteuert wird. Dies belegen die Untersuchungen von Iyer-Ramaswamy et al. [13], die bei der erblichen Form eines hepatischen Arginasedefizites mit Hyperargininämie eine deutliche Steigerung der extrahepatischen Arginaseexpression nachweisen konnten. Ochoa et al. [22] beschreiben, dass von Entzündungszellen produziertes Interleukin 4 (IL-4) und 10 (IL-10) sowie TGF- β und Katecholamine die Aktivität der extrahepatischen Arginase steigern. Darüber hinaus konnten sie eine Aktivitätssteigerung in extrahepatischem Gewebe nach Traumatisierungen nachweisen. Nach Gotoh et al. [9] führt Dexamethason in Makrophagen zur Aktivierung der Arginase (A2), während Interferon- γ (IFN- γ) diese sehr wirksam hemmt.

Von besonderem Interesse im Hinblick auf den Differenzierungsprozess der Keratinozyten ist die Verteilung des Enzyms innerhalb der Epidermis. Eigene immunhistochemische Untersuchungen und die digitale Analyse der Bilder zeigen ein Konzentrationsmaximum im Stratum basale und im unteren Stratum spinosum [29]. Diese Funktionseinheit bildet auch die germinative Zone des verhornenden Plattenepithels. In Differenzierungsrichtung kommt es zu einer funktionellen und morphologischen Metamorphose der Keratinozyten bis hin zu Korneozyten im Stratum corneum. Teil dieser Umwandlung ist der Verlust biochemischer Funktionen, zu denen offensichtlich auch die Fähigkeit zur Harnstoffsynthese gehört.

Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass L-Arginin im Konzentrationsbereich ≥ 50 mmol/l eine Aktivierung der epidermalen Arginase und damit eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration intra- und extrazellulär bedingt. Dieser Effekt ist abhängig von der Inkubationszeit. Wir fanden nach 24 Stunden lediglich eine extrazelluläre Erhöhung der Harnstoffkonzentration, hingegen nach 48 Stunden eine extra- und intrazelluläre Konzentrationssteigerung [29].

Die biologische Bedeutung von Harnstoff für die Hydratation des Stratum corneum und damit für die Barrierefunktion der Epidermis ist seit langem bekannt [30]. Harnstoff wird als einer der wichtigsten Bestandteile des physiologischen Feuchthaltefaktors (natural moisturizing factor [NMF]) der Hornschicht angesehen und ist auch im wasserlöslichen Anteil des Hautoberflächenfilms nachweisbar. Die Einzelbestandteile des NMF, kleine wasserbindende Moleküle, sind an Korneozyten sowie im Interzellularbereich lokalisiert und bestimmen die Hygroskopizität des Stratum corneum. Neben Harnstoff sind Na-Lactat, Na-Pyroglykamat und an Skleroproteine gebundene Kohlenhydrate funktionell bestimmende Anteile des NMF. Sie werden deshalb aus therapeutischen und kosmetischen Erwägungen vielfach in externen Zubereitungen als Moisturizer eingesetzt. Dies trifft insbesondere für Harnstoff zu. Darüber hinaus tragen sie zur Bildung und Aufrechterhaltung des Säureschutzmantels der Hautoberfläche bei, der bakteriostatische und antimykotische Eigenschaften aufweist [30]. Dieser Hydrolipidfilm wird wesentlich durch Transpiration und Perspiration insensibilis (transepidermal water loss [TEWL]) reguliert [31].

Die externe Substitution von Harnstoff in verschiedenen Grundlagen ist Bestandteil der Therapie und Prophylaxe (Pflegetherapie) von Dermatosen und pathologischen Hautzuständen [31]. Die Harnstoffwirksamkeit ist im Wesentlichen davon abhängig, inwieweit in den entsprechenden Hautschichten ein optimales Konzentrations-Zeit-Profil des penetrierten Harnstoffs erzielt wird. In Abhängigkeit vom Vehikelsystem sind ca. 80% der penetrierten Harnstoffmenge in den äußeren Hornlagen zu finden. In tiefere Hautschichten (vitale Epidermis, Dermis) penetrieren vergleichsweise geringe Harnstoffmengen [32]. Deshalb werden zur Therapie pathologischer Veränderungen der Funktionsstruktur tieferer Hautschichten höhere Konzentrationen benötigt und angestrebt.

In der praktischen Dermatologie und Kosmetik ist Harnstoff in der Therapie trockener Hautzustände, als keratoplastische Substanz, Penetrationspromotor und bei der Plegetherapie chronisch entzündlicher Dermatosen etabliert [30]. Hierbei ist nicht die topisch applizierte Harnstoffkonzentration an sich, sondern die tatsächlich liberierte und in die Epidermis penetrierte Konzentration sowie das Konzentrations-Zeit-Profil wesentlich [32].

Die galenische Güte von harnstoffhaltigen Externa ist bekanntermaßen sehr unterschiedlich. Deshalb ist die Unterteilung der Präparationen nach dem Harnstoffgehalt (ca. 3–15%) nicht mit der klinischen Wirksamkeit identisch. Aus diesem Grund werden Präparationen mit einem hohen Harnstoffgehalt (ca. $> 5\%$) eine bessere therapeutische Effektivität zuerkannt. Gleichwohl können diese auch verstärkt Nebenwirkungen hervorrufen [32]. Da Harnstoff keine sensibilisierende Potenz besitzt, sind insbesondere auf entzündlicher, mit Erosionen oder Rhagaden behafteter

Haut zu beobachtende Reizungen und brennende Schmerzen von praktischer Bedeutung. Dieser irritative Reizeffekt schränkt den klinischen Einsatz von Harnstoff ein.

Arginin im NO-Stoffwechsel

Einer der wohl wichtigsten Regulationsfaktoren des kardiovaskulären Systems stellt neben der vegetativen Innervation das Gas Stickstoffmonoxid (NO) dar [28]. Dies gilt für die Makro- und Mikrozirkulation in gleicher Weise. NO wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin gebildet und rasch nach Oxygenierung zu Nitraten und Nitriten metabolisiert und damit inaktiviert [16].

Es sind drei Isoformen dieses Enzyms bekannt. Neben zwei membrangebundenen, Kalzium- und Calmodulin-abhängigen Formen (cNOS oder niNOS) unterscheidet man eine zytosolische, kalziumunabhängige induzierbare Form (iNOS). Die nicht-induzierbaren Isoformen konnten in neuronalen (nNOS – im Gehirn auch bNOS) und endothelialen Zellen (eNOS) sowie Keratinozyten und die induzierbare Form (iNOS) z. B. in Makrophagen nachgewiesen werden. Alle Isoformen können einzeln oder zusammenfassend durch universal NOS(uNOS)-Antikörper nachgewiesen werden. Für die Regulation der Enzymaktivität der cNOS ist der intrazelluläre Kalziumgehalt von entscheidender Bedeutung. Die iNOS hingegen enthält zwar das kalziumbindende Protein Calmodulin, wird aber nicht kalziumabhängig gesteuert. Eine erhöhte Aktivität ist hier nur durch Proteinsynthese möglich. Alle NOS-Isoformen sind spezifisch für L-Isomere des Arginins. Sie liegen sämtlich in partikulärer (membrangebundener) und löslicher (zytosolischer) Form vor [7,16].

Die katalysierte Reaktion der NOS von L-Arginin zu L-Citrullin und NO läuft in zwei Schritten ab. Beide Teilreaktionen sind NADPH-, Kalzium- bzw. Calmodulin- (außer iNOS) und Tetrahydrobiopterin(BH₄)-abhängig. Im Zwischenschritt wird aus L-Arginin unter der Bildung von Wasser und NADP⁺ N-hydroxy-L-Arginin gebildet (Abb. 4). Die Produktstöchiometrie von L-Citrullin und NO beträgt 1 : 1 [19].

Als Kofaktoren fungieren für alle Isoformen NADPH, O₂, Tetrahydrobiopterin (BH₄) und häufig auch FAD und FMN. Die NADPH- und Flavinbindende Domäne von cNOS ist identisch

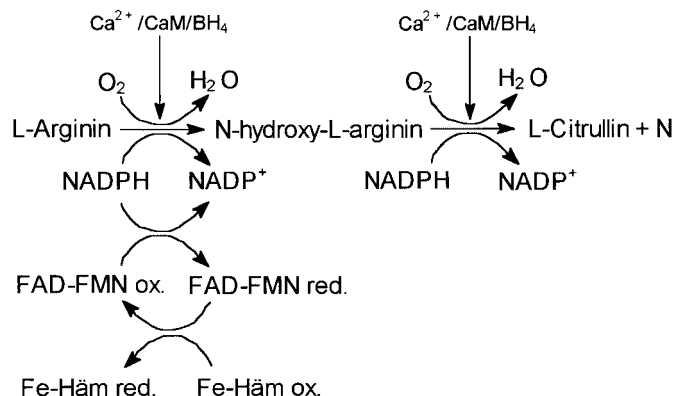


Abb. 4 Schematische Darstellung der durch die NO-Synthase katalysierten zweiphasigen Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO (nach [16]).

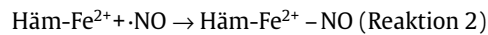
mit der Cytochrom-P450-Reduktase. Das Molekulargewicht der Monomere der Isoformen ist unterschiedlich und wird für iNOS mit ca. 130 kDa und für cNOS mit 155 kDa angegeben [16]. Darüber hinaus lassen sich Unterschiede zwischen dem löslichen und partikulären Typ nachweisen [7].

Stickstoffmonoxid stellt ein sehr triviales Molekül dar. Es besteht aus einem einfachen Sauerstoffatom, welches an ein Stickstoffatom gebunden ist. Für physiologische Regulationsvorgänge haben sich 3 biochemische Reaktionen von gelöstem NO als grundlegend erwiesen [7,16,19].

Die erste und wahrscheinlich für den In-vivo-NO-Verbrauch wichtigste Reaktion ist die irreversible und schnelle Bildung von Nitrat durch Bindung an Oxyhämoglobin (Hb) oder Oxy-myoglobin.



Die zweite Reaktion ist die Bindung von NO an eisenhaltiges Häm der Guanylat-Cyclase oder anderer Proteine. Dies ist für die Aktivierung von Signaltransduktionswegen von Bedeutung.



Die dritte Reaktion ist die Bildung von Peroxynitrit-Anionen (ONOO⁻). Dabei reagieren Superoxide (O₂^{·-}) irreversibel mit NO.



Alle aufgeführten Reaktionen bedingen zusammen wesentlich die kurze Halbwertszeit von NO. Diese bemerkenswerte Reaktionsvielfalt beruht auf einem unpaaren Elektron im so genannten „highest occupied molecular orbital (HOMO)“, also auf der äußersten Elektronenhülle (Abb. 5). Sauerstoff besitzt 6, Stickstoff dagegen nur 5 Elektronen. Somit besitzt NO insgesamt 11 Elektronen. Da auf jeder Elektronenhülle lediglich 2 Elektronen gehalten werden können, befindet sich somit ein Elektron alleine auf der äußeren Hülle [7].

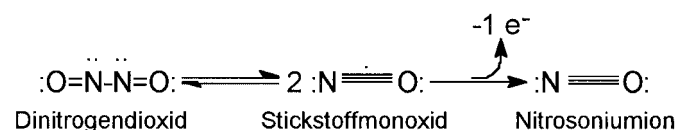


Abb. 5 Schematische Darstellung der hohen chemischen Instabilität von NO (nach [16]).

Als kleinemolekulares hydrophobes Gas durchdringt NO Zellmembranen leichter als molekularer Sauerstoff oder Kohlendioxid und benötigt keinen Rezeptor oder transmembranösen Transportmechanismus [16]. Somit verteilt sich NO isotrop im umgebenden Gewebe. Auch der Diffusionskoeffizient (bei 37 °C) von NO in Wasser ist größer als der von O₂, CO₂ oder CO. Durch die hohe Reaktionsbereitschaft hat NO eine äußerst kurze Halbwertszeit und die biologische Wirkung ist lokal begrenzt [3]. Dabei nimmt die Konzentration und damit die biologische Wirkung von NO durch Reaktion mit Sauerstoff radiär um die Bildungsstelle ab. Durch das unpaare Elektron bindet NO mit hoher Affinität an metallische Cofaktoren von Enzymen. Die Aktivierung

der Guanylat-Cyclase führt zum Anstieg des intrazellulären Messengers cGMP [7]. Dieser bewirkt eine Inaktivierung der kontraktilen Elemente in glatten Muskelzellen der Gefäßwände und führt damit zur Vasodilatation. Darüber hinaus wird eine nitriergene Neurotransmission in peripheren glatten Muskelzellen, eine Hemmung der Blutgerinnung (Thrombozytenaggregation und -adhäsion) sowie eine Modulation der synaptischen Plastizität im ZNS vermittelt [7,16,19]. Intrazelluläres cGMP wird durch die lösliche Isoform der Guanylatcyclase (sGC) katalysiert und hat Effekte auf die Transkription, die mRNA-Translation und tritt direkt mit der DNA in Wechselwirkungen [3,7]. Eine posttranslationale Modifikation von Proteinen sowie die Hemmung Fe-abhängiger Enzyme sind insbesondere in Hinblick auf den NO-Stoffwechsel von Bedeutung. Durch das Schlüsselenzym GTP-cyclohydrolase I wird GTP zu Tetrahydrobiopterin (BH₄) umgewandelt, welches einen essenziellen Cofaktor für alle Isoformen der NOS darstellt [16].

In Keratinozyten ist cNOS und iNOS als Protein nachgewiesen worden [3,28]. Über die biologische Bedeutung dieses Enzyms innerhalb des Epithels kann bisher nur spekuliert werden. Die Bedeutung von NO als Radikalfänger und bei der immunologischen Signaltransduktion steht hierbei im Mittelpunkt des Interesses [3]. Nach topischer Applikation von L-Arginin-haltigen Präparationen konnten wir einen vasodilatativen Effekt nachweisen [27,28]. Wir machen dafür eine Aktivitätssteigerung der NOS-Isoformen verantwortlich.

Von Bedeutung ist insbesondere die Funktion von NO bei der Auslösung und Unterhaltung von Entzündungsabläufen. Durch Initiation der Expression von Adhäsionsmolekülen an mikrohämovaskulären Endothelzellen [19], Verstärkung der Zytokinexpression aktivierter Lymphozyten, Aktivierung und Proliferationsstimulation von Lymphozyten, Makrophagen, Eosinophilen und Mastzellen trägt NO wesentlich zu physiologischen und pathophysiologischen Entzündungsprozessen bei. Des Weiteren ist NO für eine Maximierung der durch natürliche Killerzellen (NK) bzw. durch Lymphozyten aktivierte Killerzellen (LAK) bedingte Zytotoxizität verantwortlich und hat damit Einfluss auf tumor- sowie transplantationsimmunologische Entzündungsreaktionen. Unabhängig davon reguliert NO die Freisetzung einer Reihe von Hormonen. Insbesondere betrifft dies direkt oder indirekt Hormone mit Wirkung auf das kardiovaskuläre System. Durch die hohe Reaktivität des NO-Moleküls wird auch die antioxidative Wirkung erklärt. Hierbei kommt es vor allem zur Reaktion mit Superoxiden zu Peroxinitriden [16,19]. Superoxide sind insbesondere bei Entzündungs- und immunologischen Abläufen, sowie im Rahmen der Abwehr von Erregern von Bedeutung [19]. Es ist weiterhin bekannt, dass NO sehr intensiv an deoxygeniertes Hämoglobin unter Bildung von Nitroso-Hämoglobin und an oxygeniertes Hämoglobin unter Bildung von Meth-Hämoglobin bindet [7].

Transmembranöser Transport von L-Arginin

L-Arginin wird vorzugsweise durch das Y⁺-System Carrier-vermittelt durch Keratinozyten aufgenommen [25]. Das Y⁺-System ist ein Natrium-, Kalzium- und pH-unabhängiger, löslicher, kationischer Aminosäure-Transporter, der neben L-Arginin auch L-Lysin und L-Ornithin transportiert. Er wird mindestens durch

3 Gene (Cat1, Cat2, Cat3) kodiert und ist pH-unabhängig. Der L-Arginin-Transport ist stereospezifisch und wird durch einen Überschuss an kationischen Arginin-Analoga sowie durch die eNOS-Blocker L-NMMA und L-NIO gehemmt. Die Aktivität des Y⁺-Systems wird wahrscheinlich spannungsabhängig über Hyperpolarisation der Zellmembran gesteuert [25]. Die Öffnung Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle führt zu einer Hyperpolarisation und zum verstärkten Influx von L-Arginin über das Y⁺-System (Abb. 6). Darüber hinaus wird durch erhöhte Glukose-, Insulin- oder PGI₂-Konzentrationen [25] sowie Interleukin-1 (IL-1)- und Tumornekrosefaktor (TNF)-vermittelte Endotoxinfreisetzung die Aktivität des Y⁺-Systems gesteigert und durch Lyso-phosphatidylcholin, kationische Proteine oder Hypoxie gesenkt. Die Aktivität des Y⁺-Systems ist unter Normbedingungen sehr niedrig. Für Hepatozyten wird die intrazelluläre L-Argininkonzentration mit 5 µmol/l und die Plasmakonzentration mit 50–100 µmol/l angegeben.

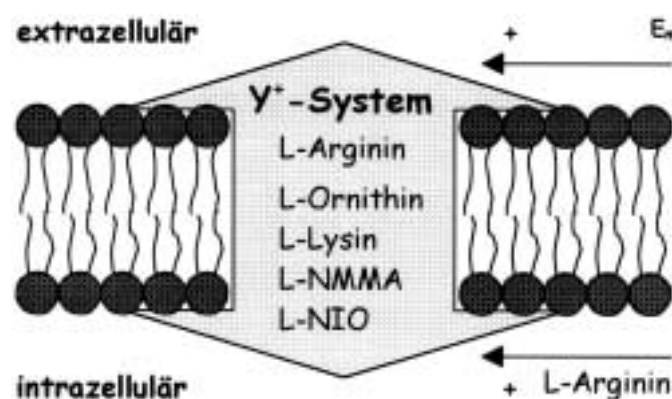


Abb. 6 Transport von L-Arginin in den Keratinozyten durch das Y⁺-System.

Über die Regulation der Expression des Y⁺-Systems an Keratinozyten liegen bisher keine Untersuchungen vor. Aus In-vitro-Ver-suchen an Hepatozyten der Ratte (FTO2B) [17] sowie humanen vascular smooth muscle cells (VSMC) und In-vivo-Untersuchungen an Ratten [17] ist bekannt, dass die Gene Cat-1 und Cat-2 von Bedeutung sind, deren Expression in unterschiedlicher Weise transkriptional und post-transkriptional reguliert werden. Die Stimulation durch Lipopolysaccharide (LPS) bewirkt bei Ratten eine Expression von CAT-1 mRNA und CAT-2B mRNA in Zellen von Lunge, Herz und Nieren. LPS-unabhängig wird CAT-2A mRNA in der Leber exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die CAT-1 mRNA-Expression in Leberzellen weitgehend stabil. Hingegen führen die Stimulation des Zellwachstums, erhöhte Insulinspiegel oder Glukokortikoidapplikation zu einer Induktion der mRNA-Expression von CAT-1 [17]. Die molekularen Mechanismen der Regulation der CAT-1 und CAT-2 Expression sind allerdings gänzlich unbekannt.

Neben diesem spezifischen Transportsystem sind unspezifische Aminosäure-Transporter bekannt, die wahrscheinlich unter physiologischen Bedingungen für L-Arginin keine große Relevanz besitzen. In diesem Zusammenhang sind das A⁻ (neutraler Aminosäure-Transporter), ASC- und B⁰⁺-System [7], welche einen Na²⁺-Gradienten an der Plasmamembran benötigen, und das L-System, welches Na²⁺-unabhängig ist, nennenswert. Bogle et al. [2] vermuten, dass bei einer erhöhten extrazellulären L-Argi-

ninkonzentration neben dem Y⁺-System auch diese unspezifischen transmembranösen Aminosäuretransporter L-Arginin in die Zelle transportieren.

Toxikologische Eigenschaften von L-Arginin

L-Arginin kann aus zytotoxikologischer Sicht als unbedenklich eingeschätzt werden [21]. Wir konnten einen proliferationshemmenden Effekt erst bei Konzentrationen von ≥ 50 mmol/l L-Arginin darstellen und zellmorphologisch nachweisen. In darunterliegenden Konzentrationen steigerte L-Arginin sogar die Thymidineinbaurate deutlich [29]. Dies unterstreicht die wichtige Bedeutung von L-Arginin für die Proteinbiosynthese und die komplexe Einbindung in den Zellstoffwechsel. Mendez et al. [20] belegten diese Bedeutung bereits an Rattenembryonen. Durch kompetitive Blockade des transzytomembranösen Transportsystems (Y⁺) des L-Arginins durch N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) [7] wurden schwere Retardierungen der Embryonen beobachtet. Zu erklären ist dieser Effekt durch den Einfluss von L-Arginin auf die Polyaminsynthese. Polyamine (z. B. Spermidin, Spermin) sind niedermolekulare Verbindungen, die nahezu ubiquitär in humanen Zellen vorkommen und einen stimulierenden und steuernden Effekt auf den Zellzyklus und damit auf die Proliferation und Differenzierung haben. Darüber hinaus beeinflusst L-Arginin die Synthese von Pyrimidinnukleotiden, die als essentielle Bausteine der DNA- und RNA-Synthese fungieren.

Dass L-Arginin in hohen Konzentrationen direkt oder indirekt auch kanzerogene Wirkung besitzen kann, steht nicht außer Zweifel, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich. Chamorro et al. [5] berichteten bei Blockade der Arginase (A2) mit (+)-S-2-Amino-6-Iodoacetamidohexansäure (2-AIHA) über die Ausbildung von Neoplasien. Ob dieser Sachverhalt mit dem intrazellulären L-Argininüberschuss in unmittelbarem Zusammenhang steht, ist unbekannt. Allerdings wurde bei Patienten mit einem seltenen hereditären AI-Defizit und einer dadurch bedingten Hyperargininämie eine Häufung von Tumoren nicht beobachtet.

Durch flowzytometrische Untersuchungen an Keratinozyten mit Propidiumjod und Annexin-V konnten wir zeigen, dass L-Arginin erst ab ≥ 50 mmol/l apoptoseinduzierend wirkt [29]. Die Applikationszeit des L-Arginins scheint allerdings nur wenig ausschlaggebend für diese Wirkung zu sein. Dies belegen auch eigene flowzytometrische Daten mit dem APO2.7-Antikörper [27,29]. Demnach wird unabhängig von der Kontaktzeit eine Apoptose konzentrationsabhängig induziert. Dabei handelt es sich um sehr hohe unphysiologische Konzentrationen, deren Relevanz auch unter therapeutischen Gesichtspunkten als sehr fragwürdig einzustufen ist.

Durch Bestimmung der LDH-Aktivität in Keratinozytenkulturen wurde nachgewiesen, dass nur lange Inkubationszeiten und hohe Konzentrationen von L-Arginin einen nekrotischen Effekt bedingen [29]. Die Annahme der zytotoxikologischen Unbedenklichkeit von L-Arginin wird somit durch eigene Untersuchungen bestätigt.

Topische Anwendung von Arginin

Die Möglichkeiten einer topischen Anwendung von argininhaltigen Präparationen sind vielfältig. Grundsätzlich muss das therapeutische bzw. pflegetherapeutische Ziel unter Beachtung der genannten biochemischen Reaktionen und den Zellen in den jeweiligen Kompartimenten des Hautorgans ausgerichtet werden.

Die topische Applikation von L-Arginin und ggf. auch in Kombination mit dem Cofaktor der Arginase Mangan (in Form von Manganorid) stehen dabei im Vordergrund des Interesses. Eigene Untersuchungen an gesunden Probanden haben gezeigt, dass die zweimal tägliche topische Applikation einer 10%igen L-Argininhaltigen amphiphilen Creme eine Senkung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) und eine Steigerung der Hydratation der Hornschicht bewirkt [27]. Dieser Effekt ist im Ausmaß etwas geringer als bei einer 10%igen harnstoffhaltigen Präparation bei Verwendung des gleichen Vehikelsystems. Wir führen diese Wirkung hauptsächlich auf eine Aktivierung der keratinozytären Arginase zurück. Darüber hinaus besitzt L-Arginin eine solubilisierende Wirkung auf Proteine und trägt dadurch zusätzlich zur Steigerung der Wasserbindungskapazität der Hornschicht bei.

In einer plazebokontrollierten Fallstudie an Patienten mit einer atopischen Disposition konnten wir feststellen, dass die nach dem Auftragen einer harnstoffhaltigen Präparation auf läsionaler Haut auftretende Reizwirkung bei L-Arginin nicht zu beobachten ist [27]. Hinsichtlich des Pflegeeffektes der L-Arginin-haltigen Präparation konnten wir im Vergleich zur harnstoffhaltigen Präparation keine Unterschiede feststellen. Aus kosmetischer und pflegetherapeutischer Sicht bietet sich somit eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten.

Die Nutzung von L-Arginin als Substrat der NOS-Isoformen in Keratinozyten und kutanen mikrovaskulären Endothelzellen stellt ein weiteres potenzielles Anwendungsgebiet dar. Dabei stehen vor allem die immunmodulatorischen und antimikrobiellen Eigenschaften von NO im Mittelpunkt des Interesses. Einzelfallbeobachtungen lassen vermuten, dass eine regelmäßige topische Anwendung von L-Arginin-haltigen Präparationen bei Patienten mit trockener Haut die Keimdichte auf der Haut reduziert und bakterielle (Staph. aureus) und virale (Molluscum contagiosum-Viren) Superinfektionen durch Minderung der Keimadhärenz und immunmodulatorische Einflüsse erschwert. Weiterhin bewirkt die vermehrte Expression von NO eine Verstärkung der UV-induzierten Zytotoxizität. Durch Aktivierung von NK- und LAK-Zellen ist eine Suppression der malignen Transformation von Zellen grundsätzlich möglich.

Ob diese Wirkoptionen praktische Relevanz besitzen, muss in Studien nach GCP-Richtlinien belegt werden. Die bisher vorliegenden Daten zur topischen Anwendung von Arginin sind aber aus kosmetischer und pflegetherapeutischer Sicht vielversprechend.

- ¹ Abd El Aleen SA, Ferguson MW, Appleton I, Kairsingh S, Jude EB, Jones K, McCollum CN, Ireland GW. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and venous leg ulcers. *J Pathol* 2000; 191: 434–442
- ² Bogle RC, Baydoun AR, Pearson JD, Mann GE. Regulation of L-arginine transport and nitric oxid release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J Physiol Lond* 1996; 490: 229–241
- ³ Brittenden J, Heys SD, Eremin O. Immunological properties of L-arginine. In: Eremin O (ed). *L-Arginine: Biological aspects and clinical application*. New York: Springer, 1997
- ⁴ Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by N^G-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 1996; 271: H1988–1998
- ⁵ Chamorro G, Salazar M, Salazar S, Ceballos G, Trujillo J, Munoz O, Yanez R. Antifertility effects of (+)-S-2-amino-6-iodoacetamidohexanoic acid (2-AIHA) in female rats. *Contraception* 1996; 53: 247–251
- ⁶ Dupré J, Curtis JD, Waddell RW, Beck JC. Alimentary factors in the endocrine response to administration of arginine in man. *Lancet* 1968; 2: 28–29
- ⁷ Feelisch M, Stamler SJ. *Methods in nitric oxide research*. Chichester: Wiley, 1996
- ⁸ Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 233: 487–491
- ⁹ Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Letters* 1996; 395: 119–122
- ¹⁰ Hassan AS, Milner JA. Alterations in nucleic acid and nucleotides in arginine deficient rats. *Metabolism* 1981; 30: 739–744
- ¹¹ Heys SD, Broom J, Eremin O. L-Arginine: Biochemistry and basic biology. In: Eremin O (ed). *L-Arginine: Biological aspects and clinical application*. New York: Springer, 1997
- ¹² Imms FJ, London DR, Neame RLB. The secretion of catecholamines from the adrenal gland following arginine infusion in the rat. *J Physiol* 1969; 200: 331–335
- ¹³ Iyer-Ramaswamy K, Bando JM, Jenkinson CP, Vockley JG, Kim PS, Kern RM, Cederbaum SD, Grody-Wayne W. Cloning and characterization of the mouse and rat type II arginase genes. *Mol Gen Metabol* 1998; 63: 168–175
- ¹⁴ Jenkinson CP, Grigor MR. Rat mammary arginase: Isolation and characterization. *Biochem Med Meta Biol* 1994; 51: 156–165
- ¹⁵ Jude EB, Boulton AJ, Ferguson MW, Appleton I. The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1. *Diabetologica* 1999; 42: 748–757
- ¹⁶ Lancaster J. *Nitric oxide*. San Diego: Academic press, 1996
- ¹⁷ Liu J, Hatzoglou M. Control of expression of the gene for the arginine transporter Cat-1 in rat liver cells by glucocorticoids and insulin. *Amino Acids* 1998; 15: 321–337
- ¹⁸ Louis CA, Reichner JS, Henry WL, Mastrofrancesco B, Gotoh T, Mori M, Albina JE. Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: Regulation by oxygen tension. *Am J Physiol* 1998; 274: R775–782
- ¹⁹ MacAllister R, Benjamin N. L-arginine and nitric oxide system. In: Eremin O (ed). *L-Arginine: Biological aspects and clinical application*. New York: Springer, 1997
- ²⁰ Mendez JD, Yanez R, Wong C, Hicks JJ. Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development. *Contraception* 1986; 33: 597–604
- ²¹ Merimée TJ, Lillicrap DA, Rabinowitz D. Effect of arginine on serum-levels of human growth-hormone. *Lancet* 1965; 2: 668–670
- ²² Ochoa JB, Bernard AC, Mistry SK, Morris SM, Figert PL, Maley ME, Tsuei BJ, Boulanger BR, Kearney PA. Trauma increases extrahepatic arginase activity. *Surg St Louis* 2000; 127: 419–426
- ²³ Ratner S. Enzymes of arginine and urea synthesis. *Adv Enzym* 1973; 39: 1–90
- ²⁴ Salimuddin H, Nagasaki A, Gotoh T, Isobe H, Mori M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1999; 277: E110–117
- ²⁵ Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE. Activation of L-arginine transport (system y⁺) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol* 1996; 490: 775–781
- ²⁶ Williams-Ashman HG, Pegg AE. Aminopropyl group transfers in polyamine biosynthesis. In: Morris DR, Marton LJ (eds). *Polyamines in Biology and Medicine*. New York: Marcel Dekker, 1981
- ²⁷ Wohlrab J. *Der Einfluss von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase*. Aachen: Shaker, 2001
- ²⁸ Wohlrab J, Körting R, Marsch WC. Induktion der NO-Synthase-Isoenzyme in HDMEC durch L-Arginin. *Dermatosen* 1999; 47: 19
- ²⁹ Wohlrab J, Siemes C, Marsch WC. The Influence of L-arginine on the regulation of epidermal arginase. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 52: 44–54
- ³⁰ Wohlrab W. Die Therapeutische Harnstoffwirkung auf die Haut. *Dermatologica* 1977; 155: 97–107
- ³¹ Wohlrab W. Bedeutung von Harnstoff in der externen Therapie. *Hautarzt* 1989; 40: 35–41
- ³² Wohlrab W. *Galenik und Pharmakologie von Harnstoffpräparaten*. *Dt Derm* 1990; 38: 619–625