

Tissue distribution and function of arginase I : an experimental study

Citation for published version (APA):

Sankaranarayanan, S. (2015). *Tissue distribution and function of arginase I : an experimental study*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2015

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

In dit proefschrift komen verschillende aspecten van het arginine metabolisme aan de orde. De rol van arginine en arginase in de synthese van ureum mag als bekend worden verondersteld. Echter, arginine en arginase spelen ook een zeer belangrijke rol in de fysiologie van macrofagen (*hoofdstuk 1*). Macrofagen zijn een heterogene groep cellen die ingedeeld worden op basis van hun weefselverdeling, activiteit, en oppervlaktemarkers. In navolging van de T_{H1}/T_{H2} naamgeving worden ze vaak ingedeeld als klassiek (M1) of alternatief (M2) geactiveerde macrofagen. M1 macrofagen zouden vooral verantwoordelijk zijn voor het opruimen van tumorcellen en micro-organismen, terwijl M2 macrofagen betrokken zijn bij wondgenezing, doden van parasieten en immuun regulering. Omdat de wefseldistributie en het fenotype snel kunnen veranderen in reactie op omgevingsfactoren en vergelijkbare functies teweeggebracht kunnen worden door verschillende factoren, past een classificering op grond van functies beter.

De verschillende typen macrofagen verschillen in hun gebruik van arginine voor stikstofoxide (NO via NO synthases) en ornithine synthese (via arginase). NOS2 is de belangrijkste NOS isoform in macrofagen die tumorcellen en micro-organismen opruimen, terwijl arginase 1 m.n. in macrofagen wordt aangetroffen die betrokken zijn bij wondgenezing, het opruimen van parasieten en de immuun regulering. In muizenmacrofagen wordt de expressie van arginase sterk gestimuleerd door de T_{H2} -type cytokines IL4, IL10, IL13 en TGF β , terwijl arginase in humane macrofagen alleen door eencellige parasieten wordt geïnduceerd. Om de betekenis van arginine voor het functioneren van macrofagen beter te begrijpen hebben wij genetisch gemodificeerde muismodellen gemaakt waarin arginase tot overexpressie komt of waarin arginase of argininosuccinaat synthetase wefselfspecifiek kan worden geïnactiveerd (*hoofdstukken 2,3,5, en 6*).

De ontwikkeling van technieken om de nucleotidenvolgorde van een gen in embryonale stamcellen te modificeren stelt ons in staat om de expressie van deze genen in levende organismen, meestal muizen, te veranderen. Vooral uitschakeling (knock-out) of vervanging (knock-in) van genen is een krachtig instrument gebleken. In *hoofdstuk 2* bespreken we daarom onze ervaringen met het maken van 3 zogenaamde conditionele knock-out muizen. Uitschakeling van de expressie van een gen in slechts één weefsel is nodig als deletie in alle cellen niet met het leven verenigbaar is. Daarnaast is een dergelijke muis beter geschikt om de functie van het betreffende gen in één type weefsel of op een bepaald moment in het leven te onderzoeken. Het maken van een conditionele knock-out muis vergt ten minste 2 jaar en bestaat uit een relatief groot aantal opeenvolgende stappen die elk voor zich “haken en ogen” hebben. Dit hoofdstuk beschrijft onze ervaring met de constructie van de vectoren welke nodig zijn voor het wijzigen van de nucleotidenvolgorde van een gen en de protocollen om het relatief geringe aantal embryonale stamcellen dat per “targeting” op de juiste wijze gewijzigd is op te sporen en te vermeerderen. Door de komst van de “CRISPR” (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, een gen editerend systeem) en “TALENs” (transcription activator-like

effector nucleases, een soort restrictie-enzymen) is de opzet van targeting vectoren sterk veranderd. De daarop volgende selectie en vermeerdering van de juiste stamcel is nog grotendeels hetzelfde als toen dit overzicht werd samengesteld.

In **hoofdstuk 3** wordt de eerste toepassing van de door mij vervaardigde conditionele *arginase1* knock-out muis beschreven. Astma is een chronische ontsteking van de kleine luchtwegen, vaak als gevolg van overgevoeligheid voor een bepaald allergeen. De expressie van *arginase1* in macrofagen is vrijwel afwezig in de long van controle muizen en zeer sterk verhoogd in de longmacrofagen van muizen waarin door sensibilisering tegen het kippeneiwit ovalbumine astma is opgewekt. Met behulp van een stabiele variant van acetylcholine kan de reactiviteit van de luchtwegen getest worden. In deze studie hebben we de expressie van *arginase1* in macrofagen uitgeschakeld met zogenaamde Tie2Cre (uitschakeling in alle hematopoïetische cellen) en LysMCre (uitschakeling in allen de macrofagen) transgenen. Helaas bleek LysMCre slechts in ~60% van de macrofagen voldoende actief om *arginase1* te elimineren, terwijl dat 96-98% was voor Tie2Cre. De studie rapporteert alleen de effecten in mannelijke muizen waarvan het *arginase1* gen met Tie2Cre is uitgeschakeld. Longfunctie werd met de “Flexivent” gemeten. Uitschakeling van *arginase1* in macrofagen veranderde de allergische reactie op ovalbumine sensibilisering en de weerstand in de grotere luchtwegen niet, maar verbeterde wel de functie van de kleinere luchtwegen. Voorts was de expressie van andere arginine-verbruikende enzymen en van arginine transporters, van de chemokines *Ccl2* en *Ccl11*, van de pro-inflammatoire cytokines *Tnfa* en *Ifng*, en van de epitheliale markers *Ccl3* en *Muc5ac* verminderd. De expressie van de voor astma typische genen *Il4*, *Il5*, en *Il13* was echter niet veranderd. Analyse van de correlaties tussen de verschillende parameters liet duidelijk zien dat arginase deficiëntie in macrofagen de coördinatie van de reactie op ovalbumine sensibilisering verminderde. De verwachte vermindering van de ontstekingsreactie werd dus niet waargenomen.

Moedermelk bevat relatief weinig arginine, maar aminozuren waaruit arginine gemaakt kan worden, zoals proline en glutamine, zijn rijkelijk aanwezig. De dunne darm van knaagdieren en varkens produceert arginine uit proline in de zoogperiode. Voorts lijden parenteraal gevoede zuigelingen vaak aan een te lage concentratie arginine (en daardoor een te hoge concentratie ammoniak) in hun bloed. Dit deed ons de vraag stellen of de dunne darm van de mens ook arginine zou kunnen maken. Om dit aannemelijk te maken beschrijven we in **hoofdstuk 4** metingen aan darmdoorsneden van 89 kinderen en volwassenen die semi-kwantitatief aangekleurd zijn op de aanwezigheid van de cruciale enzymen carbamoylfosfaat synthetase (CPS), ornithine aminotransferase (OAT), argininosuccinaat synthetase (ASS), arginase-1 en -2 (ARG1 en ARG2), en NO synthases (NOS1, -2, en -3). De CPS en ASS concentraties waren hoog tussen 23 weken zwangerschap en 3 jaar na de geboorte en daalden in de volgende 2 jaar tot het volwassen niveau. De OAT concentratie daalde ook, maar meer geleidelijk, terwijl ARG1 niet aantoonbaar was en ARG2 in de neonatale periode tot het volwassen niveau steeg. De

neuronen van de enterische plexus brachten ASS, OAT, NOS1 en ARG2 tot expressie, terwijl de zenuwen in de muscularis propria alleen ASS en NOS1 tot expressie brachten. Het endotheel van de arteriolen bracht ASS en NOS3 tot expressie en de gladde spierlaag eromheen OAT en ARG2. Op grond van deze bevindingen hebben we geconcludeerd dat de dunne darm van de mens ook de capaciteit heeft om arginine te maken. De expressie van ASS verdwijnt, net als die van lactase, geheel tussen 3 en 5 jaar na de geboorte, wat suggereert dat dat de normale speentijd van de mens als soort is.

Omdat alle tot nu toe bestudeerde zoogdieren, zoals in het vorige hoofdstuk is beschreven, in hun zuigelingenperiode alle enzymen die nodig zijn om arginine te maken in de enterocyten van de dunne darm tot expressie brengen, hebben we het enzym argininosuccinaat synthetase met behulp van het VillinCre transgen specifiek in deze enterocyten uitgeschakeld (*hoofdstuk 5*). De volledigheid van de uitschakeling in de enterocyten is vervolgens immunohistochemisch aangetoond (er wordt ook argininosuccinaat synthetase in de zenuwen van de darm tot expressie gebracht; zie vorige hoofdstuk). Onverwacht bleken deze muizen echter geen tekort aan arginine in hun bloed te hebben. We hebben daarom de flux van aminozuren in de darm en de lever bepaald. Hiervoor werd ook de arteriële bloedstroom naar de darm, de lever, en de nieren gemeten in 14-dagen oude muizen (respectievelijk 86%, 14% en 33% van de totale bloedstroom door de lever). Door de deletie van *Ass* in de enterocyten verdween de netto arginine synthese in de darm, terwijl de citrulline synthese verdubbelde. Voorts nam de arginine productie in de lever af of veranderde zelfs in een opname. Deze veranderingen in de lever vinden normaliter pas na het spenen plaats, als de darm niet langer arginine produceert. In overeenstemming met deze waarnemingen nam de expressie van enzymen die betrokken zijn bij de stofwisseling of het transport over de levercelmembraan toe, terwijl (behalve uitschakeling van *Ass*) geen veranderingen in gen expressie in de enterocyten werden gevonden. Deze waarnemingen wijzen er dus op dat de voortijdige (genetische) verwijdering van arginine biosynthese uit de enterocyten leidt tot een premature inductie van het patroon van aminozuurstofwisseling in de lever dat normaliter pas na het spenen wordt gezien.

In *hoofdstuk 6* is gezocht naar een mechanisme dat het fenotype van “F/A2” muizen verklaart. Deze transgene muizen brengen *arginase1* tot overexpressie in de enterocyten van de dunne darm en hebben een fenotype dat lijkt enigermate lijkt op een deficiëntie van het groeihormoon IGF1 (insulin-like growth factor-1; te laag plasma arginine gehalte, verminderde haargroei, en onvolledige rijping van B-cellen). Lage arginine concentraties bleken de secretie van groeihormoon (GH) in hypofysecellen te remmen en de concentratie van *Igf1* mRNA in de lever en het plasma IGF1 gehalte te verlagen, maar niet dat in de atrofische spieren. GH suppletie van de muizen deed weliswaar het *Igf1* mRNA gehalte in de lever toenemen, maar niet de groei van de F/A2 muizen. Arginine depletie in het kweekmedium van de C2C12 spiercellijn activeerde voorts GCN2 signalering, maar liet dat van mTORC1 ongemoeid. GCN2 signalering, een

endoplasmatisch reticulum stress response, wordt geactiveerd door deficiëntie van belangrijke aminozuren. In homozygote F/A2 neonaten bedragen de plasma en weefsel concentraties van arginine slechts ~25% van de wild-type waarden. *Gcn2*-deficiente F/A2 muizen sterven kort na de geboorte door hypoglycemie, zodat activering van GCN2 kennelijk essentieel is voor het overleven van F/A2 neonaten. Omdat “downstream” effecten van andere stress kinases (eIF2 α fosforylering, *Chop* expressie) niet verhoogd waren in *Gcn2*-deficiente F/A2 muizen, konden de effecten van arginine deficiëntie aan GCN2 signalering worden toegeschreven.

In **hoofdstuk 7** ten slotte worden pro's en con's van arginine en citrulline suppletie om een arginine deficiëntie te bestrijden besproken.