

Expression und Regulation des γ^+ -Systems in kutanen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kristin Recker

geb. am: 20.04.77 in: Halle/ Saale

Gutachter:

1. PD Dr. med. J. Wohlrab
2. Prof. Dr. rer. nat. R. Neubert
3. Prof. Dr. med. Dr. – Ing. J. Lademann

Halle (Saale), der 8.9.04

urn:nbn:de:gbv:3-000007206

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007206>]

1	Einleitung	1
1.1	Theoretische Grundlagen.....	3
1.1.1	L-Arginin-Stoffwechsel in der Haut.....	3
1.1.2	Das γ^+ -System	4
1.1.3	Psoriasis vulgaris vom Plaque-Typ als Modell inflammatorischer Prozesse in der Haut	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Chemikalien	8
2.1.2	Gebrauchslösungen.....	11
2.1.3	Geräte und Gebrauchswaren.....	12
2.1.4	Sterilisation von Lösungen und Geräten	14
2.1.5	Molekulargewichtsstandard.....	14
2.1.6	Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials.....	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Selektionierung und Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)	16
2.2.2	Selektionierung und Kultivierung von Keratinozyten	17
2.2.3	Flowzytometrische Bestimmung des von-Willebrand-Faktors.....	17
2.2.4	Mycoplasmentest	18
2.2.5	Vitalitätstest.....	19
2.2.6	Designen der Antikörper	19
2.2.7	RNA-Isolierung.....	20
2.2.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.2.9	Modifikation von Nukleinsäuren durch anabolische Enzyme	21
2.2.9.1	Reverse-Transkription (cDNA-Synthese)	21
2.2.9.2	In-vitro-Transkription (RNA-Synthese)	22
2.2.10	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.10.1	PCR an komplementärer DNA (RT-PCR)	23
2.2.10.2	Real-Time-PCR.....	24
2.2.11	Elektrophorese	25
2.2.11.1	Horizontale Agarosegel-Elektrophorese.....	26
2.2.11.2	SDS-Gelelektrophorese	26
2.2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	27

2.2.13	Sequenzierung von DNA.....	27
2.2.14	Proteinbestimmung	29
2.2.15	Western Blot-Analyse.....	29
2.2.16	L-Arginin-uptake.....	30
2.2.17	Immunhistochemie (ABC-Methode)	31
2.2.18	Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate.....	32
2.2.19	Statistik	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Nachweis der Expression des γ^+ -Systems in Keratinozyten und HDMEC34	
3.1.1	Nachweis auf RNA-Ebene	34
3.1.2	Nachweis auf Proteinebene	36
3.2	Untersuchungen zur Expressionsstärke der γ^+ -Transportergene.....	38
3.3	Untersuchungen zur in vitro Zytotoxizität	40
3.3.1	Toxizität von L-Arginin-Hydrochlorid in NHEK.....	40
3.3.2	Toxizität von L-Ornithin-Hydrochlorid in NHEK	41
3.3.3	Toxizität von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ in NHEK.....	41
3.3.4	Toxizität von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ in HDMEC.....	42
3.4	Regulation des γ^+ -Systems durch kationische Aminosäuren in NHEK	43
3.4.1	Einfluß von L-Arginin auf die RNA-Expression.....	43
3.4.2	Einfluß von L-Arginin auf die Proteinbiosynthese.....	45
3.4.3	Einfluß von L-Ornithin auf die RNA-Expression	46
3.4.4	Einfluß von L-Ornithin auf die Proteinbiosynthese	48
3.5	Regulation des γ^+ -Systems durch TH1-Zytokine.....	50
3.5.1	Einfluß der Zytokine auf die mRNA-Expression des γ^+ -Systems in HDMEC	50
3.5.2	Einfluß der TH1-Zytokine auf die L-Arginin-Aufnahme in HDMEC.....	53
3.5.3	Regulation des γ^+ -Systems durch TH1-Zytokine in NHEK.....	54
3.6	Immunhistologischer Vergleich von hCAT1- und 2-Expression in Hautbiopsien von Psoriatikern und Hautgesunden	56
4	Diskussion	61
4.1	Wird der γ^+ -Transporter in Hautzellen exprimiert und gibt es Unterschiede in der Expression der einzelnen Komponenten?.....	61
4.2	Haben kationische Aminosäuren einen Einfluß auf die Expression des γ^+ - Transporters?.....	64

4.3	Haben TH1-Zytokine Einfluß auf den γ^+ -Transporter?	68
4.4	Spielt der γ^+ -Transporter eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis?..	72
4.5	Haben die aufgeführten Erkenntnisse eine klinische Relevanz oder Einfluß auf zukünftige Therapien? (Ausblick)	73
5	Zusammenfassung.....	76
6	Literaturverzeichnis	81

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CaM	Calmodulin
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
d	<i>day</i>
<i>dpm</i>	<i>disintegration per minute</i>
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGM	endothelial cell growth medium
eIF-2	Elongationsfaktor-2
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
<i>for</i>	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
[³ H]	Tritium
HaCaT	Human adult low calcium high temperature
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hCAT	human cationic amino acid transporter
HCl	Hydrochlorid
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
hEGF	human epidermal growth factor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

kb	Kilo Basen
kDA	Kilo Dalton
L-Arg	L-Arginin
L-Lys	L-Lysin
L-Orn	L-Ornithin
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliamper
min	Minute
Mio.	Million
MPC	Magnetic Particle Concentrator
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NHEK	native humane epidermale Keratinozyten
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase eNOS (endothelial NOS) iNOS (inducible NOS) nNOS (neuronal NOS)
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
rev	reversed
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
sec.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

Aminosäuren sind als Bausteine der Proteine essentiell zur Aufrechterhaltung vitaler Prozesse. Eine besondere Rolle im Zellmetabolismus spielen dabei kationische Aminosäuren, hier insbesondere L-Arginin und L-Ornithin (Barbul et al., 1995). So ist Arginin, als semiessentielle Aminosäure an 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, Spermidine und Putrescin). L-Arginin ist außerdem ein Vorläufer des Stickstoffmonoxids, 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 einen 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 allerdings 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). Das y^+ -System 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). Etwa 60 - 80 % der gesamten L-Arginin-Aufnahme in Säugerzellen wird durch das äußerst selektive y^+ -System gewährleistet. Der Transporter wird durch die CAT (*cationic amino acid transporter*)-Proteine repräsentiert, die wiederum durch mindestens 4 Transkripte codiert werden. Die Beobachtung, daß einige CAT-Isoformen gewebespezifisch exprimiert werden und daß ihre Konzentrationen in den jeweiligen Geweben je nach Umgebungsbedingungen variieren legt nahe, daß der Transporter für die kationischen Aminosäuren, zellspezifisch regulatorischen Prozessen unterliegt

(MacLeod, 1996; MacLeod and Kakuda, 1996). Bei einer krankhaft bedingten Steigerung der L-Arginin-Aufnahme wäre somit auch das Auftreten einer chronisch entzündlichen Hautreaktion denkbar. Das Überangebot an Arginin würde den beiden Enzymen Arginase und Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) zur Verfügung stehen. Eine Metabolisierung der Aminosäure durch die NOS zu Stickstoffmonoxid würde zur Auslösung und Unterhaltung immunologischer Prozesse führen können (Brittenden et al.; 1997), wie sie beispielsweise bei Psoriasis und atopischer Dermatitis auftreten. Hohe Konzentrationen an NO wirken darüber hinaus antiproliferativ (zytotoxisch) und führen zur Zelldifferenzierung, während niedrige NO-Konzentrationen z.B. auf Keratinozyten proliferationssteigernd wirken (Krischel et al., 1998).

Bei chronisch entzündlichen Hautzustände mit und ohne Hyperproliferation könnte daher eine Einflußnahme auf das γ^+ -System, zu neuen Therapieansätzen führen.

Zielstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von kationischen Aminosäuren und von TH1-Zytokinen auf die Expression des γ^+ -Systems in verschiedenen Hautzellen bzw. in Hautgewebe untersucht. Insbesondere wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Wird das γ^+ -System in kutanen Zellen auf transkriptioneller und translationeller Ebene exprimiert?
2. Welche Konzentrationen der verwendeten Substanzen wirken zytotoxisch?
3. Wie beeinflussen die kationischen Aminosäuren L-Arginin und L-Ornithin die Expression des γ^+ -Systems in den untersuchten Zelltypen?
4. Beeinflussen TH1-Zytokine die Expression des γ^+ -Systems?
5. Wie ist die Verteilung der Proteine hCAT1 und 2 innerhalb der Epidermis von Hautgesunden und Psoriatikern?
6. Gibt es eine Veränderung im Expressionsmuster von hCAT1 und/ oder 2 bei einer Psoriatikern?

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 L-Arginin-Stoffwechsel in der Haut

L-Arginin ist eine semi-essentielle, kationische Aminosäure, die zur Gruppe der Diaminomonocarbonsäuren zählt. Die Aminosäure ist leicht wasserlöslich, besitzt glukoplastische Eigenschaften und wird von den meisten Säugern selbst synthetisiert. Aus dermatologischer Sicht ist L-Arginin vor allem deshalb interessant, da es neben der Protein- und Kreatinsynthese das Substrat zweier bedeutsamer enzymatischer Reaktionen ist (Heys et al.; 1997). Einmal der Arginase-Reaktion, bei der L-Arginin durch die Arginase zu Harnstoff und L-Ornithin umgesetzt wird (Jenkinson et al.; 1994). Hierbei kommt dem L-Arginin als Harnstoffquelle eine Schlüsselfunktion bei der Bildung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barrierefunktion zu und es bestimmt somit indirekt die Hydratation des Stratum corneums entscheidend mit. Außerdem dient L-Arginin als Ausgangssubstanz für die Bildung von L-Ornithin, welches seinerseits als Precursor der Polyaminsynthese gilt. Polyamine (z.B. Spermidin, Spermin) spielen eine zentrale Rolle bei der Stimulation der Zellproliferation, dem Gewebewachstum, der Differenzierung, der Angiogenese und der Wundheilung (Williams-Asham et al., 1981). Zum anderen dient L-Arginin als Substrat für die Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase-Reaktion. Hierbei wird aus der Aminosäure katalytisch durch die NO-Synthase NO und L-Citrullin synthetisiert (Feelisch et al.; 1996; Heys et al.; 1997; Lancaster et al.; 1996; McAllister et al.; 1997). Auf diesem Weg trägt L-Arginin durch die Generierung von NO zur Regulation des hämo- und lymphovaskulären Systems bei (Brittenden et al.; 1997; Lancaster et al.; 1996). Zu erwähnen seien hier vor allem die vasodilatorischen, die radikalischen Eigenschaften und die Funktion von NO bei der Auslösung und Unterhaltung von immunologischen Prozessen (Brittenden et al.; 1997). So trägt NO durch die Initiation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei mikrovaskulären Endothelzellen (McAllister et al.; 1997), die Verstärkung der Zytokinexpression aktivierter Lymphozyten (Agner et al.; 1989; Kolitz et al.; 1991), und die Aktivierung und Proliferationsstimulation von Lymphozyten (Brittenden et al.; 1996), Makrophagen (Agner et al.; 1989), Eosinophilen und Mastzellen (Brittenden et al.; 1996) wesentlich zu physiologischen und pathophysiologischen Entzündungsprozessen bei. Die hohe Reaktivität des Moleküls erklärt die zytotoxische Wirkung hoher NO-Konzentrationen. So entstehen bei der Reaktion mit Superoxiden die äußerst reaktiven Peroxynitrite

(Lancaster et al.; 1996; McAllister et al.; 1997), die ein enorm oxidativ schädigendes Potential gegenüber DNA, Proteinen und anderen zellulären Komponenten aufweisen (Stefano and Magazine; 2001). Eine weitere wichtige Eigenschaft von NO ist die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch Nitrosation. Die daraus resultierende Erhöhung des cGMP-Spiegels führt schließlich über eine Signalkaskade zu einer Inaktivierung kontraktile Elemente der glatten Gefäßwandmuskelzellen, was eine Vasodilatation zur Folge hat (Beck et al.; 1999).

1.1.2 Das γ^+ -System

Das membranständige γ^+ -System spielt eine dominierende Rolle bei der Aufnahme von L-Arginin in die Säugerzellen (Abbildung 1.1-1). So wird etwa 60-80% des gesamten L-Arginintransportes über dieses System gewährleistet. Es ist selektiv und stereospezifisch und transportiert ausschließlich die L-chiralen Formen der kationischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin. Der Transport der Aminosäure L-Arginin kann durch die um dieses System konkurrierenden Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin als auch durch die NOS-Inhibitoren L-Monomethyl-L-Arginin, L-N-(iminoethyl)ornithin, L-Canavanin und N-Nitro-L-Arginin

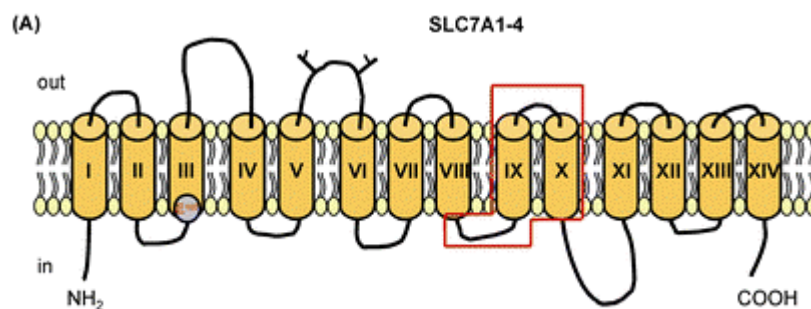


Abbildung 1.1-1 Schematische Darstellung der Verankerung der γ^+ Transporter- Proteine in der Membran.

inhibiert werden (DeGeorge et al., 1997). Der Transport ist unabhängig von Natrium (Christensen and Antonioli; 1969), Kalium und vom pH-Wert (Collarani and Oxender; 1987). Das γ^+ -System wird durch die CAT-Proteine repräsentiert, die wiederum beim Menschen durch mindestens 4 Transkripte codiert werden, die Gene hCAT1-4. 1991 wurde als erstes Protein dieses Systems SLC7A1 (Kim et al., 1991; Wang et al.,

1991) als Mitglied der *solute carrier family 7* (SLC7) und murinen Rezeptor eines ekotropen 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 NH₂- und COOH-Termini ist. Dieses Protein zeigte sich bei Knockout-Versuchen mit Mausmutanten essentiell für die Vitalität der Tiere, die ohne hCAT1-Protein kurz nach der Geburt starben (Perkins et al., 1997). Um die Maus als Modellsystem für den Menschen nutzen zu können, wurden die Gensequenzen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine absolute Übereinstimmung beider Sequenzen von 86,5% (Closs et al., 1997).

Als eine Besonderheit codiert das Gen hCAT2 für zwei Splicevarianten, die aus einem primären Transkript entstehen (Hoshida et al., 1996): der niedrigaffinen Form hCAT2A (Closs et al., 1993) und der hochaffinen Form hCAT2B (Kakuda et al., 1993). Die einzelnen Proteine werden Gewebe-spezifisch exprimiert und scheinen dort auch unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen. So wird hCAT2A hauptsächlich in der Leber exprimiert (Closs et al., 1993) und hCAT2B vorwiegend in Makrophagen, in denen das Protein, den für die Aufrechterhaltung der NO-Produktion erforderlichen Arginintransport unterhält (Kakuda et al., 1999; Nicholson et al., 2001).

Zunächst ausschließlich in Rodentia beschrieben (Ito et al., 1997; Hosokawa et al., 1997; Hosokawa et al., 1999), konnte hCAT3 erst vor kurzem identifiziert werden. In der Maus und in der Ratte wird CAT3 ausschließlich Neuronen-spezifisch exprimiert, während sich beim Menschen eine Expression in verschiedenen peripheren Geweben, hauptsächlich im Thymus, aber auch in den Burkitt's Lymphomzellen, im Uterus, Testes, Milchdrüsengewebe, Gehirn, Ovarien und im Magen zeigt (Vekony et al., 2001). Das letzte Gen, das als Mitglied des y⁺-Systems diskutiert wird, ist hCAT4. Wie auch hCAT3, ist es jedoch bislang kaum untersucht worden. Das Protein besitzt 13 transmembran durchspannende Domänen, fünf N-Glykosylierungsstellen und 2 putative Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen. Das Gen besitzt lediglich eine Homologie von 38,5 % zu hCAT1 und 37,8 % zu hCAT2 und sein 2,4 kb großes Transkript wird im Gehirn, in den Testes und in der Placenta exprimiert (Sperandeo et al., 1998).

1.1.3 Psoriasis vulgaris vom Plaque-Typ als Modell inflammatorischer Prozesse in der Haut

Die Psoriasis (Schuppenflechte) als chronisch-entzündliche Systemerkrankung mit besonderer Präzipitation an Haut und gelenknahem Knochen wird heute als autoimmunologisches Syndrom aufgefaßt. Es ist unbestritten, daß dem Erkrankungsbild eine genetische Disposition zu Grunde liegt, deren phänotypische Relevanz durch externe Faktoren beeinflusst werden kann. Ätiopathogenetisch wird mikrobiellen Antigenen (Streptokokkenspezies) eine besondere Bedeutung bei der Initiation immunologischer Signalkaskaden zu geschrieben. Bisher ist letztlich ungeklärt, welche Genloci das molekulare Äquivalent der vererbaren Disposition darstellen. Dem Chromosomenabschnitten 1p; 1cen-q21; 3q21; 4q; 6p21.3; 16q; 17q sowie 19q wird dabei eine besondere Bedeutung zu erkannt, wenn gleich auch eine Vielzahl weiterer Genloci diskutiert werden. Für die Auslösung der Erkrankung scheinen jedoch verschiedene Provokations-/ Triggerfaktoren in Frage zu kommen, wie z.B. mikrobielle Faktoren, Stress, Toxine, Verletzungen usw. Jedoch zeigen sich 56-97% der Erstmanifestation nach einer Streptokokkenangina. Daher wird vermutet, daß Streptokokkentoxine periphere T-Zellen in Form von Superantigenen polyklonal aktivieren und somit eine Immunantwort auslösen (Prinz, 2001). Da die Peptidstruktur der Streptokokkenproteine (sog. M-Proteine) und die Spaltprodukte der epithelialen Keratine, vor allem 6 und 17, eine enge Verwandtschaft aufweisen, könnte es hier zu einer „molekularen Mimikry“ kommen, die während der bakteriellen Infektion oder danach zur Psoriasis führt (Hausmann et al., 1997). Verschiedene Untersuchungen des zellulären Infiltrates in psoriatischen Läsionen haben gezeigt, daß es zum Einwandern von zytotoxischen T-Zellen in die Epidermis und von Helfer-T-Zellen in die obere Dermis kommt. Diese wiederum induzieren sekundäre Phänomene (Zytokinkaskaden). So bewirkt die Sekretion bestimmter Zytokine ($\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) eine erhebliche Steigerung der proliferativen Aktivität von basalen Keratinozyten (Prinz et al., 1994; Vollmer et al., 1994), wodurch das Phänomen der Hyperkeratose zu erklären ist. Die Keratinozytenneubildung ist hier von normalerweise 28-30 d auf ca. 7 d verkürzt. Die reifen Zellen bilden auf der Hautoberfläche große Zellhaufen und formen die bekannten roten Plaques.

Da L-Arginin die Ausgangssubstanz zweier Produkte ist, deren Über- bzw. Unterproduktion maßgeblich zu dieser Proliferationsstörung beitragen (Williams-

Asham et al., 1981; Brittenden et al., 1996), könnte der Transport dieser Aminosäure in die Zelle ein bedeutendes pathogenetisches Moment der Psoriasis sein. So kann L-Arginin im kutanen Zellstoffwechsel sowohl in Harnstoff als auch in NO umgewandelt werden (Heys et al., 1997; Jenkins et al., 1994). Beide Substanzen sind aus dermatologischer Sicht von Bedeutung. So trägt Harnstoff als Moistruizer maßgeblich zur Aufrechterhaltung der epidermalen Barrierschicht und NO zur Regulation der kutanen Mikrozirkulation bei. Die Regulation des L-Arginin-Transportes könnte somit zu einem neuen therapeutischen Konzept bei der Behandlung der Psoriasis führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
AEC Plus Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Arginin-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
BamHI Restriktionsendonuclease	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethyl-pyrocbonat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
Dispase I (aus <i>Bacillus polymyxa</i>)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dynabeads (M-450)	Dynal, Oslo, Norwegen
Dynemic ET terminator Cycle Sequence Kit	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Endothelzell-Medium (EGM-MV)	Cellsystems, St. Katharinen, Deutschland
Entwickler- 6 Fixiererlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Eosin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol (absolut)	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
D-Glukose (85 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
High Pure Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Hoechst 33258 Färbelösung	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Isotonische Lösung	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Glücksklee Nestlé, Frankfurt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Ornithin-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR-Nukleotid-Mix (dNTP's)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Protein-Assay-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37%ig	VEB Laborchemie Apolda, Apolda, Deutschland
SDS (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
SP6-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Taq-Polymerase (+ MgCl_2 -Puffer)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Taq-Polymerase (Advantage 2 Polymerase Mix)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
TRIS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Tween20	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Ultramount Einschlußmedium	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Antikörper und Primer

Anti-human-hCAT1, polyklonal	DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland
Anti-human-hCAT2, polyklonal	Biocarta, Hamburg, Deutschland
Anti-human-hCAT4, polyklonal	Biocarta, Hamburg, Deutschland
Anti-PECAM-1 (CD31), monoklonal	R&D Systems, Abingdon, UK
Anti-Rabbit IgG, Peroxydase-konjugiert	Calbiochem, LaJolla, Kalifornien, US
Anti-von Willebrand (anti-vWF-FITC)	CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen, Deutschland
Goat-IgG-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, Kanada
Primer (sense) und (antisense) für hCAT1, hCAT2, hCAT2a, hCAT2b, hCAT3, hCAT4	Metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, Martinsried, Deutschland
Randomprimer (pd(N) ₆)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA

2.1.2 Gebrauchslösungen

Blocking-Reagenz	1 × TBS + 5 % Trockenmilchpulver + 0,05 % Natriumazid
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Ladepuffer	1 mM EDTA + 30% Glycerol + 1 Spatelspitze Orange G
Lysispuffer	0,2 % SDS; 0,2 M NaOH
Mc Ilvain Puffer	Lösung A: 0,1 M Zitronensäure Lösung B: 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 8,6 ml Lös. A + 10,4 ml Lös. B, pH 5,5
PBS-Puffer (phosphat buffered saline)	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na ₂ HPO ₄ + 0,2 g KH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O ad 1000 ml A. bidest. pH 7,4 (mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl)
PBS-B	PBS, pH 7,4 1 % BSA
PBS-T	PBS-B + 0,2 % Tween 20
Puck/EDTA	0,4 g KCl + 8,0 g NaCl + 0,35 g NaHCO ₃ + 1,0 g D-Glucose + 5 mg Phenolrot + 0,255 g EDTA ad 1000 ml A. bidest.
Sammelgelpuffer (10%)	0,5 M Tris/HCl (pH 6,5), 0,8% SDS
SDS-Probenpuffer	5% Mercaptoethanol, 2,8% SDS, 14% Glycin, 90 mM Tris pH 6,8, 0,1 % Bromphenolblau
TBE-Puffer (10 ×)	500 mM TRIS + 500 mM Borsäure + 20 mM EDTA ad 1000 ml A. bidest., pH 8,2
TBS-Puffer (10 ×)	0,1 M Tris pH 7,4, 1,54 M NaCl in A. bidest.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,8% SDS
Tyrode-Eosin-Lösung	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,2 g CaCl ₂ + 0,1 MgCl ₂ + 0,05 g NaH ₂ PO ₄ + 1,0 g NaHCO ₃ + 1,0 g Glucose + 0,625 g Eosin ad 1000 ml A. bidest.
Uptake-Puffer	140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,9 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 5,6 mM D-Glucose; 25 mM HEPES pH 7,4
Westernblotpuffer	20 mM Tris pH 8,8; 150 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol

2.1.3 Geräte und Gebrauchswaren

Absorptionsreader (MTP-Photometer)	Labsystems iEMS Reader MF, Helsinki, Finnland
Absorptionsreader-Software	Sero Calc Vers. 4.0
Analysenwaage	Typ MC5-OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Blot-Apparatur für Westernblot	Hoefer SemiPhor, Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Brutschrank	Vitromat Mytron, Typ sbs-11, Heiligenstadt, Deutschland INCO 2 Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Cell-Harvester und Vakuum-Controller	INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
Deckgläser	VEB Ilmenau, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Durchflußzytometer (FACScan)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Durchflußzytometer-Software	PASCAL 3.22 (Systemsoftware) Lysis II Vers. 1.1 CellFit-Software Vers. 2.01.2
Elektrophoresekammer (incl. Gelschlitten) [horizontal]	OWI Separation Systems, Porthmouth, Niederlande
Elektrophorese-Apparatur [vertikal]	Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech; San Francisco, Kalifornien, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,7 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge	EC 5402, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler	WINSPECTRAL 1414 Liquid Scintillation Counter, WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, Deutschland
Füllspatel	VEB Dentalfabrik Treeurt, Deutschland
Gelblotting-Filterpapier (0,37 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Gewebekulturflaschen und-schalen (25-cm ² , 75-cm ² , Ø 60 mm)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Glasfiberfilter	Typ G-7, INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz

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

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

2.1.4 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitze unempfindliche Lösungen und Gebrauchswaren wurden für 30 min bei 120°C und 10⁵ Pascal autoklaviert, während hitzeempfindliche Lösungen über einen Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert wurden.

2.1.5 Molekulargewichtsstandard

DNA-Längenstandards	<i>DNA Molecular Weight Marker VI</i> (0,15-2,1 kbp) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland <i>DNA Molecular Weight Marker VIII</i> (0,19-1,114 kbp) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
---------------------	--

Protein-Längensstandard *High Molecular Weight Standard Mixture for SDS Gel Electrophoresis SDS-6H (30-200 kDa)*
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,
Deutschland

2.1.6 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

Für alle verwendeten menschlichen Materialien liegt die Zustimmung der Ethik-Kommission vor.

Gewebeproben

Für immunhistologische Untersuchungen wurden Exzisate Hautgesunder und Psoriatiker verwendet. Die Präparate beider zu untersuchender Gruppen wurden aus diagnostischen Gründen entnommen, in Paraffin eingebettet und retrospektiv in der Histologischen Labor der Unipoliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gelagert. Die Patienten hatten vor der Entnahme unterschrieben erklärt, ihre Hautproben wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung zu stellen. Aus insgesamt 7 Jahrgängen (1996-2002) wurden insgesamt 33 und 17 Präparate mit der eindeutigen Diagnose Psoriasis vulgaris verwendet bzw. 18 und 32 Präparate von Probanden mit klinisch unauffälligen Hautproben (lateraler Bereich der peritumoralen Haut mit einem Sicherheitsabstand von 3 cm von exizidierten Malignen Melanomen), die als Kontrollgruppe eingesetzt wurden. Als Ausschlußkriterien für die Psoriasisproben galten: vorhandene Begleiterkrankungen, Sekundärinfektionen oder starke Endzündungsreaktionen. Weitere Ausschlußkriterien für methodische Fehler waren: falsche Schnittebene, im Paraffinblöckchen kein ausreichendes Material mehr vorhanden, histologisch eindeutige Psoriasis vulgaris-Zuordnung nicht möglich, Artefakte oder Schnittfehler.

Zelltypen

Für die RNA-Isolierung wurden zwei verschiedene Zelltypen verwendet, die (humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen/HDMEC und native Keratinozyten/NHEK) als native Zelllinien frisch aus neonatalem Vorhautgewebe mehrerer Spender gewonnen wurden. Eine dritte, eine permanente Zelllinie (HaCaT), wurde von Prof. N. E. Fusenig, Deutsches Krebsforschungsinstitut Heidelberg Deutschland, zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Selektionierung und Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Zum Anlegen einer Primärkultur von HDMEC wurden die nach der Exzision erhaltenen ca. 2 cm² großen Hautstücke in einer Transportlösung (25 µg Gentamycin in 5 ml SFM) bei 4°C bis zur Präparation maximal 4 h gelagert. Nachdem das subkutane Fettgewebe mechanisch entfernt und die Haut in 5 × 5 mm große Stücke geschnitten wurde, folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht in steriler Dispase-lösung I (2 mg/ml in HBSS gelöst mit 25 µg Gentamycin). Am nächsten Tag wurden die Hautstücke der Lösung entnommen, die Epidermis mechanisch entfernt und das dermale Gewebe in einer sterilen HBSS-Gentamycinlösung zerkleinert. Anschließend folgte eine 10-minütige Inkubation in 2-5 ml 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37°C und eine Filtration der Zellsuspension durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße). Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 2 ml 5 % FKS/HBSS zugegeben. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1500 U/min wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 0,5 ml 5 % FKS/HBSS resuspendiert und mit anti-CD31-beschichteten Dynabeads leicht schüttelnd bei 4°C für 20 min inkubiert. Im Anschluß folgte die Zellseparierung mit Hilfe des „Magnetic Particle Concentrator“s (MPC), wobei das Reaktionsgefäß mit den Zellen und den Dynabeads solange im MPC blieb, bis sich das Zellpellet an der Gefäßwand gesammelt hatte und ein klarer Überstand verblieb. Dieser wurde verworfen und die Zellen mehrmals über diese Prozedur mit 0,5 ml 5 % FKS/HBSS gewaschen. Schließlich wurden die separierten Zellen in 5 ml EGM-MV (mit 5 % FKS, 50 µg/ml Gentamycin, 50 ng/ml Amphotericin-B, 1 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml hEGF, 12 µg/ml Rinderhypophysenextrakt) suspendiert und in 25 cm²-Kulturflaschen bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Eine adhärenente Einzelschicht konnte nach 9-11 Tagen erhalten werden. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.2.2 Selektionierung und Kultivierung von Keratinozyten

Die Selektionierung und Kultivierung von nativen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) erfolgte ebenfalls aus juvenilem Vorhautgewebe. Die Vorbereitung der Hautstücke bis hin zur Trennung der Epidermis von der Dermis folgte der unter 2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise, jedoch wurde anschließend die Epidermis weiterverwendet. Diese wurde von der Dermis abgezogen und in sterile Zentrifugationsröhrchen mit 2 ml Trypsin-EDTA überführt und bei 37°C für 20 min inkubiert. Alle 5 min wurde das Material mit einer Pipette resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml des in PBS steril gelösten Sojabohnen-Trypsin-Inhibitors in einer Endkonzentration von 10 mg/ml wurde die Trypsinierung gestoppt. Die Zellen wurden anschließend mit 500 rpm bei RT 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml Kompletmedium (25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE) und 0,2 ng/ml rekombinanter epithelialer Wachstumsfaktor (rEGF)) aufgenommen und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden zur Kultivierung 3×10^6 Zellen mit 12 ml Kompletmedium in eine T-75-Kulturflasche überimpft und bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung der HaCaT-Keratinozyten fand unter denselben Bedingungen in DMEM-Medium statt.

2.2.3 Flowzytometrische Bestimmung des von-Willebrand-Faktors

Die Identität und Reinheit einer Zellkultur kann nicht nur durch morphologische Kriterien, sondern auch durch verschiedene biochemische Parameter festgestellt werden. Zur Untersuchung der Effizienz der Methode zur Separierung von HDMEC unter Verwendung anti-CD31-beschichteter Dynabeads wurde der von Willebrand Faktor (Faktor VIII) als ein weiterer charakteristischer Marker für Endothelzellen bestimmt (Mason et al., 1996; Chan et al., 1998; Richard et al., 1998).

Adhärente Zellen der unter 2.2.1 beschriebenen Methode wurden mit PUCK-EDTA gespült, mit 0,05 % Trypsin-EDTA und 5 % FKS/HBSS behandelt und nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählers (Z2, Coulter gmbH, Krefeld, Deutschland) eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 Mio. Zellen in 0,5 ml PBS-B hergestellt. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 1250 U/min in

Falcon-Tubes zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet aufgeklopft. Durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol wurden die Zellen fixiert und wieder zentrifugiert. Nach Zugabe von je 1ml PBS-B bzw. PBS-T und Zentrifugation für 3 min bei 1250 U/min wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln mit 10 µl anti-human-vWF-FITC (0,1 µg/µl) bzw. 10 µl Goat-IgG-FITC (Negativkontrolle; 0,1 µg/µl) inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml PBS-B und einer Zentrifugation für 3 min bei 1250 U/min. Das entstandene Zellpellet wurde schließlich in 1 ml PBS resuspendiert und flowzytometrisch vermessen.

2.2.4 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind prokaryotische Mikroorganismen der ältesten Entwicklungsstufe. Im Gegensatz zu anderen Bakterien besitzen sie keine Zellwand und sind bei Tier und Mensch als Erreger von Krankheiten bekannt. Sie gefährden die Vitalität kultivierter Zellen, können deren Morphologie verändern und beeinflussen nachhaltig ihren Stoffwechsel. Um dies auszuschließen, wurden die Zellkulturen einzelner Passagen der isolierten HDMEC, NHEK bzw. HaCaT stichprobenartig auf Mycoplasmen überprüft.

Hierzu wurden die Zellen für 48-72 h auf sterilen Deckgläsern, die in EGM-MV bzw. DMEM gefüllten Kulturschälchen lagen, im Brutschrank bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die mit einzelnen Zellclustern bewachsenen Deckgläser wurden mit PBS gespült und 5 min mit 3 ml Fixierlösung (Eisessig:Methanol = 1:3) fixiert. Der Fixierungsvorgang wurde dreimal wiederholt. Nachdem die Deckgläser an der Luft getrocknet waren, wurden die Zellen 10 min mit 0,1 µg/ml Hoechst 33258 gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest. mit 1 Tropfen Mc Ilvain-Puffer auf Objektträgern eingebettet. Mit einem Fluoreszenzmikroskop erfolgte schließlich die optische Auswertung (Chen, 1977). Bei positiven Befund wurden die Zellen verworfen.

2.2.5 Vitalitätstest

Bei der Vitalfärbung mit Gentianaviolett (Triphenylfarbstoff) wurde die Lebendzellzahl nach Noxenexposition über das Anfärben des Gesamtproteins der lebenden Zellen bestimmt. Die Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen konnte dabei durch die Fähigkeit zur Adhärenz bei lebenden Zellen gewährleistet werden. Nach Applikation der verschiedenen Testsubstanzen und anschließender Inkubation wurde das Medium aus den 48er Kulturplatten dekantiert und die toten Zellen dabei mit verworfen. Die nachfolgende Zugabe von 400 µl Methanol pro Well diente der Denaturierung bzw. der Fixierung der vitalen Zellen am Boden der Kulturplatte. Nach 20 min wurde das Methanol entfernt und die restlichen avitalen, nicht adhären Zellen vorsichtig mit Leitungswasser von den Wells heruntergespült. Danach wurden 200 µl 0,1%ige ethanolische Gentianaviolettlösung je Well aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 10 min sorgfältig dekantiert und ungebundener Farbstoff abgewaschen. Um für die Absorptionsmessung eine homogene Farblösung zu erhalten, wurde im Anschluss je 200 µl 0,1 M Natriumcitratlösung zugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte bei 620 nm im Absorptionsreader.

2.2.6 Designen der Antikörper

Da Antikörper gegen die Peptidsequenzen der einzelnen hCAT-Proteine (im Anhang) bislang nicht kommerziell erhältlich sind, wurden diese unter Berücksichtigung der potentiellen Anwendungsmöglichkeiten zunächst designed (Tab.2-1) und anschließend zur Herstellung an die Firmen Biocarta und Biermann in Auftrag gegeben.

Die synthetisierten Peptide wurden jeweils zwei Kaninchen über 63 Tage alle 15 Tage intramuskulär und subkutan injiziert und parallel je ein Preimmunserum (2 ml) entnommen. Zusätzlich wurden noch 2 Immunseren in 14-tägigem Abstand entnommen (je 15-20 ml). Anschließend wurde der Titer im Elisa-Test gegen das Peptid bestimmt und die Seren gegen das Peptid bzw. Protein G gereinigt. Es war jeweils eine Ausbeute von 10 – 20 mg Antikörper zu erwarten.

2.2.7 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen (modifiziert nach Chomczynski und Sacchi, 1987) wurde nach dem Standard-Protokoll für Kulturzellen des „High Pure RNA Isolation Kit“ von Boehringer Mannheim durchgeführt. Das Prinzip des Kits bzw. dessen Spezifität beruht darauf, daß in Gegenwart eines chaotropen Salzes Nukleinsäuren spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden werden. Die Bindungsreaktion wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren verursacht. Durch eine DNase I Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies werden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Nach einfachen Waschschritten kann die RNA frei von Begleitsubstanzen in Wasser eluiert werden.

Zur RNA-Isolierung wurden 10^6 Zellen in 200 µl sterilen PBS resuspendiert und in 400 µl Lysepuffer lysiert. Diese Probe wurde in ein High Pure Filter Tube pipettiert und bei 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und auf das Glasvlies, welches nun die gelösten Nukleinsäuren enthielt, ein Gemisch aus 90 µl DNase-Inkubationspuffer und 10 µl DNase I gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach verschiedenen Waschschritten (je 500 µl Waschpuffer I und II bzw. nochmals mit 200 µl Waschpuffer II) und Zentrifugationsschritten (jeweils 10000 rpm für 15 s) konnte die RNA gereinigt mit 50 µl Elutionspuffer vom Glasvlies eluiert werden.

2.2.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der Spektralcharakteristika ihrer Basen, die ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, absorbieren Nukleinsäuren Licht zwischen einer Wellenlänge von 250-270 nm. Um Verunreinigungen der RNA durch Proteine zu bestimmen, wird außerdem bei einer Wellenlänge von 280 nm der Gehalt an Tyrosin- und Tryptophanresten gemessen.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{RNA}} = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

C_{RNA}	= Konzentration der gemessenen Nukleinsäure in $\mu\text{g/ml}$
E_{260}	= Extinktion der Nukleinsäure
E_{320}	= Nullwert
f	= Verdünnungsfaktor
c	= Extinktionskoeffizient

Ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 260 nm, bei einer Küvettschichtdicke von 1 entspricht etwa einer Konzentration von [nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz] :

50 $\mu\text{g/ml}$ bei doppelsträngiger DNA

40 $\mu\text{g/ml}$ bei RNA und

25 $\mu\text{g/ml}$ bei DNA-Oligonukleotiden.

Der Quotient aus dem gemessenen Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der Nukleinsäurelösung an. Bei sehr reiner RNA-Lösung liegt der Quotient bei 1,9 und 2,0.

2.2.9 Modifikation von Nukleinsäuren durch anabolische Enzyme

Eine gezielte Handhabung von geringen Mengen an Nukleinsäuren im pmol bis fmol-Bereich ist bislang nur mit enzymatischen Methoden zu erreichen. So ist es durch verschiedene Enzyme möglich, geringe Mengen eines beliebigen Nukleinsäurefragments in ein sich autonomreplizierendes System umzuwandeln.

2.2.9.1 Reverse-Transkription (cDNA-Synthese)

Der reversen Transkription (Kogan et al., 1987) liegt eine Umschreibung von RNA in komplementäre DNA mit anschließender PCR zugrunde. Für die Erststrangsynthese wurde der SuperscriptTM II-RT-Kit von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach folgendem Standardprotokoll verwendet:

Schritt 1

0,5 μg RNA

25 pmol Random Primer

wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Danach wurden je 3,9 µl des Mastermixes zu jedem Ansatz hinzugegeben.

Mastermix

2	µl	5 × Puffer
1	µl	DTT
0,5	µl	dNTP
0,25	µl	DEPC-Wasser
0,25	µl	Superscript II

Der Ansatz wurde für 10 min bei 20°C und anschließend für 50 min bei 42°C inkubiert. Danach konnte die cDNA in die Reaktion von 2.2.8.2 eingesetzt werden.

2.2.9.2 In-vitro-Transkription (RNA-Synthese)

Mit Hilfe eines spezifischen Enzyms aus phageninfizierten Bakterien, der SP6-Polymerase, konnten die zuvor in einer PCR amplifizierten und über DNA-Elution gereinigten cDNA-Fragmente der Gene hCAT1, 2b und 4 wieder in RNA umgeschrieben werden, um dann in definierten Konzentrationen als Standard in einer Real-Time-PCR eingesetzt zu werden. Die Primer, die zur Amplifikation dieser Genstücke eingesetzt wurden, wurden zuvor mit einer SP6-Teilsequenz designt, die als Erkennungsregion für die SP6-Polymerase dient.

Hierzu wurde folgender Ansatz erstellt:

13	µl	extrahierte cDNA
2	µl	rNTP
2	µl	10 × Puffer
1	µl	RNA sin Inhibitor
2	µl	SP6-Polymerase

und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

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

2.2.10.1 PCR an komplementärer DNA

Zum Nachweis der Genexpression wurden je 100 ng der cDNA mit je 10 pmol/l genspezifischem Primer 1 und 2, 100 µM dNTPs, 10 × Reaktionspuffer und 1 U Taq-Polymerase in einem 25 µl Ansatz über 30 Zyklen in einem Thermocycler inkubiert. Um jede PCR vorher zu etablieren, wurde immer von folgendem Standardprogramm ausgegangen, um dann gegebenenfalls die Annealingtemperatur zu optimieren:

95 °C	3 min	Vordenaturierung	
95 °C	45 sec.	Denaturierung	} 30 Zyklen
55 °C	45 sec.	Annealing	
72 °C	1 min	Elongation	
72 °C	7 min	Elongation	

Über eine geeignete Gelelektrophorese (2.2.11.1) wurde das Ergebnis auf seine Spezifität hin überprüft.

2.2.10.2 Real-Time-PCR

Mit der quantitativen Real-Time-PCR ist es möglich, über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes kontinuierlich die Menge an Produkt, während der PCR in vielen PCR-Ansätzen gleichzeitig zu messen. Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate. Dadurch erreicht man, daß nur das Produkt doppelsträngig vorliegt und ein Fluoreszenzsignal aussendet. Je mehr Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Dieser Punkt wird als C_t -Wert (Threshold-Cycle) definiert und befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Über eine Standard-Kurve ist es möglich, aus dem C_t -Wert einer Probe die Konzentration an spezifischer mRNA zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Real-Time-PCR mit dem Rotorgene 2000-System der Firma LTF und dem Fluoreszenzfarbstoff SyBrGreen durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität des in doppelsträngige DNA interkalierenden SyBrGreen ist wesentlich höher als die des freien SyBrGreen. Zur Kontrolle der Amplifikate wurden die Proben nach dem letzten PCR-Zyklus in 0,5°C-Schritten von 50°C bis auf 95°C erhitzt und dabei gleichzeitig die Fluoreszenzintensität gemessen. Die erste Ableitung der Fluoreszenzintensität ergibt die Schmelzkurve, in der das spezifische Produkt als einheitlicher Peak erscheinen sollte.

Anhand der Schmelzkurve kann die Messtemperatur optimiert werden. Sollten z.B. Nebenpeaks durch Primerdimere auftreten, so muß die Messtemperatur höher gewählt werden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Rotorgene-Software (Vers. 4.6). Neben der absoluten Quantifizierung über eine Standardkurve besteht auch die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung. Bei dieser komparativen Auswertung kann aus der 2. Ableitung der Rohdaten und der mittleren Amplifikationseffizienz aller Ansätze, der Startpunkte (take off point) jeder Reaktion berechnet werden. Dieser Take off point definiert in Analogie zum C_t -Wert, wann das Fluoreszenzsignal größer als der Hintergrund wird. Die Konzentrationsangabe erfolgt dann relativ zu einer definierten Kontrollprobe. Die Amplifikationseffizienz der einzelnen Proben sollte dabei nicht zu stark von der mittleren Effizienz abweichen.

Für die Quantitative Real-Time-PCR wurde der QuantiTec-Reaktionskit (Qiagen) benutzt. Dieser Kit enthält eine HotSart-Taq-Polymerase, welche erst durch 15-minütige Inkubation bei 95°C aktiviert wird. Dadurch beginnt die Reaktion erst mit dem Start der PCR.

8	µl	Ampuwa
8	µl	2 × QuantiTec-Fertigmix (Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl ₂ , HotSart-Taq, stabilisiertes SyBrGreen)
0,5	µl	Primer 1 (0,5 µM Endkonz.)
0,5	µl	Primer 2 (0,5 µM Endkonz.)
1	µl	Template

Die DNA wurde anschließend in folgendem Programm amplifiziert:

95 °C	15 min	Vordenaturierung	
94 °C	15 s	Denaturierung	} 35 Zyklen
60 °C	30 s	Annealing	
72 °C	30 s	Elongation	
77 °C	15 s	Elongation	
40 °C	30 s		
50 – 99 °C	in 0,5 °C Schritten erhitzen auf 2 °C herunterkühlen		

2.2.11 Elektrophorese

Alle molekularbiologisch interessanten Moleküle, d.h. Nukleinsäuren und Proteine, enthalten geladene oder ionisierbare Gruppen. Aufgrund ihrer Ladung können sie mittels Elektrophorese in einem elektrischen Feld gerichtet bewegt werden. Durch die Wahl der gelbildenden Substanzen und der physikalischen Eigenschaften wird ein „Molekularsiebeffekt“ erreicht, wodurch sich die Moleküle aufgrund ihrer Größe bei gleicher Ladung unterschiedlich schnell im elektrischen Feld bewegen (Seyffert, 1998).

2.2.11.1 Horizontale Agarosegel-Elektrophorese

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

Die Horizontale Agarosegel-Elektrophorese dient der Ergebnisüberprüfung verschiedener Modifikation von DNA und RNA (z.B. RNA-Isolierung, Real-Time-PCR, PCR, cDNA-Synthese usw.). DNA-Proben laufen je nach erwarteter Fragmentgröße in 1,2 bis 3%igen mit 300 µg/l Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen bei konstanter Spannung. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 0,5 × TBE durch Kochen gelöst, abgekühlt und in die Gelschlitzen gegossen. Nach vollständigem Erhärten des Gels wurden die Proben mit 0,25 Vol. Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gele liefen ca. 1 h bei 80 V.

2.2.11.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Ladung eines Proteins wird von der Anzahl geladener Aminosäurereste und somit von der Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Sie kann für die verschiedenen Aminosäuren jedoch unterschiedlich sein und ist z.T. pH-Wert-abhängig. Um dies zu umgehen, finden die meisten Proteinauftrennungen in einem SDS-Gel statt. SDS besteht aus einer aliphatischen Kette von 12 C-Atomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe. Diese Kette lagert sich entlang der Aminosäurekette der Proteine an und bildet einen SDS-Protein-Komplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete, negative Sulfatgruppen aufweist. Somit wird die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS-Proteinkomplexes vernachlässigbar. Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar und die Mobilität des Proteins ist somit proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse.

Für eine optimale Auftrennung der um 70 kDa großen Proteine wurden zunächst zwei 10%ige Trenngele gegossen, welche sich aus 5 ml Wasser, 2,5 ml Trenngelpuffer, 2,5 ml Acrylamid (38%); 5 µl TEMED und 75 µl APS (10 %) zusammensetzten. Direkt nach dem Gießen wurde Isopropanol auf das Gel gegeben, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation der Gele wurde das Isopropanol restlos entfernt und zwei 5%-ige Sammelgele (2,5 ml Wasser; 1 ml Sammelgelpuffer; 0,5 ml Acrylamid; 5 µl TEMED; 36 µl APS) aufgegossen, in die jeweils zur Ausbildung von Probenaschen ein Kamm eingesetzt wurde. Im Anschluß an die Polymerisation des Sammelgels konnte der Kamm entfernt und die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt werden. Abschließend wurde je 20 µg Protein mit der entsprechenden Menge an SDS-Probenpuffer aufgetragen, nachdem die Proben 3 min bei 95°C erhitzt worden waren. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 120 V für 2,5 h nach einer 20minütigen Einlaufzeit bei 80 V.

2.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Trennung spezifischer DNA-Einzelfragmente von anderen Fragmenten, Salzen und/oder anderen Verunreinigungen, die in späteren Reaktionen (z.B. Sequenzierung, Ligation usw.) störend wirken können, erfolgte über die Methode der DNA-Elution mit Hilfe des „MinElute Gel Extraction Kit“ von Qiagen.

Hierzu wurden die spezifischen, aufgetrennten Fragmente (2.2.11.1) in Form eines Agaroseblöckchens aus dem Gel ausgeschnitten und 3 Vol. des Puffers QG zu einem Vol. des Gels gegeben. Um das Agarosegel zu lösen, wurde dieses Gemisch für 10 min bei 50°C erhitzt. Anschließend wurde 1 Vol. Isopropanol hinzugegeben und auf eine MinElute Säule des Kits aufgetragen und zentrifugiert.

2.2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977). Diese Methode beruht auf der Ermittlung von DNA-Sequenzen durch kontrollierten Abbruch der DNA-Synthese. Dazu wird doppelsträngige DNA denaturiert, wodurch über Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers und über

die enzymatische Aktivität der DNA-Polymerase ein Einzelstrang aufgefüllt wird. Eine limitierte Zugabe von ddNTPs hat statistische, basenspezifische Kettenabbrüche zur Folge. Bei der nichtradioaktiven Sequenzierung sind diese mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgt die Anregung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden über Filter auf Photomultiplier geleitet und mit Hilfe eines Computers in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt. Die entsprechende Sequenz wurde jeweils als Ausdruck des Chromatogramms und als elektronische Datei erhalten.

Der Amersham-Kit TS I stellte sich als besonders geeignet für die Sequenzierung von PCR-Produkten heraus. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit folgenden Chemikalien durchgeführt:

8 μ l	„Dye Terminator Cycle Sequencing“-Stocklösung
1 μ l	Primer (10 μ M)
11 μ l	DNA (\approx 1 ng)

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte im Mastercycler 5330 der Firma Eppendorf nach folgendem Programm:

96 °C	1 min	Vordenaturierung	
96 °C	30 sec.	Denaturierung	} 27 Zyklen
50 °C	15 sec.	Annealing	
60 °C	4 min	Elongation	
60 °C	4 min	Elongation	

Nach Abschluß der Reaktion wurde die DNA mit 7 μ l Natriumacetat (2 M) und 68 μ l Ethanol_{abs.} für 20 min auf Eis gefällt und anschließend für 15 min bei 13000 rpm und 10 °C pelletiert. Das Pellet wird mit 150 μ l 70%-igem Ethanol gewaschen, wieder zentrifugiert, luftgetrocknet und in 4 μ l Formamid/EDTA-Puffer aufgenommen. Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgte auf einem ABI-Sequencer

733 der Firma Applied Biosystems im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät in Halle.

2.2.14 Proteinbestimmung

Für die Western Blot-Analyse und für die Proteinbestimmung wurden 1 Mio. Zellen in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert durch 10minütiges Kochen bei 95°C und 3 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nachdem die Suspension auf RT abgekühlt war, wurde der Proteingehalt nach der Methode von Lowry bestimmt. Dazu wurden 10 µl der jeweiligen Proben mit 990 µl Aqua dest. in einem Eppendorfgefäß vermischt bzw. 1 ml Aqua dest. als Leerwert in ein Tube gegeben. Als nächstes wurden 100 µl DOC-Lösung zu den Proben und dem Leerwert gegeben und für 10 min inkubiert. Danach folgte die Proteinfällung mit 100 µl Trichloressigsäure (72 %) und einer 5minütigen Zentrifugation bei 10000 U/min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Lowrylösung resuspendiert und in Falconröhrchen überführt. Die Eppendorfgefäße wurden nochmals mit 1 ml Aqua dest. gespült und ebenfalls in die Falconröhrchen gegeben und für 20 min inkubiert. Als letzte Substanz wurde 500 µl Folin und Ciocalteu's Phenol Reagenz hinzugegeben, gut gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. 200 µl der Lösungen wurden anschließend in 96er-well MTP überführt und die Extinktion bei 690 nm am Mikrotiterplattenreader gemessen. Der Proteingehalt wurde über eine zuvor erstellte Proteineichkurve mit im Kit enthaltenen Rinderserumalbuminstandards bestimmt.

2.2.15 Western Blot-Analyse

Wegen der überragenden Trennschärfe werden Proteingemische auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt (2.2.11.2). Der hohe Vernetzungsgrad dieses Gelytyps verhindert einen effizienten Transfer der Proteine nach dem Vorbild des Southern-Transfers. Aus diesem Grunde werden Proteine durch direkte Elektrophorese (Sandwich-Verfahren) aus dem Gel auf Nitrocellulosefilter übertragen.

Dazu wurde das SDS-Gel luftblasenfrei auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, welche zuvor 1,5 min bei 600 W in Western Blot-Puffer erhitzt und für 15 min ausgekühlt lassen wurde. Die Nitrocellulosemembran befand sich auf 3 in Western

Blot-Puffer getränkten Whatmanpapieren. Nachdem das Gel aufgelegt war, wurde dieses nochmals mit 3 getränkten Whatmanpapieren bedeckt. Alle drei Sandwichkomponenten (Whatmanpapier, Gel, Nitrocellulosemembran) wurden auf eine Größe von $8,5 \times 4,5$ cm geschnitten. Der Deckel des Blotters wurde mit 1 kg beschwert und ein Strom von 80 mA (entspricht ca. 1 mA/cm^2 der Nitrocellulosemembran) angeschlossen. Nach 1,5 h wurden die Markerbanden mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet und die Membran über Nacht in Blockingreagenz bei leichtem Schütteln inkubiert, um alle potentiellen Bindungsstellen des Nitrocellulose-Filters abzusättigen. Danach wurde das Blockingreagenz entfernt und die Membran mit der primären Antikörperlösung für 2 h bei leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit $1 \times$ TBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 h dekoriert (Anti-Rabbit IgG, Heavy and Light Chain (Goat) Peroxidase konjugiert). Um den störenden Hintergrund zu entfernen wurden nochmals mehrere Waschschrte mit $1 \times$ TBS angeschlossen. Nach Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran 1 min mit 2 ml ECL-1 und -2-Gemisch inkubiert und jeweils für 10 min mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette exponiert. Anschließend konnte der Film entwickelt und densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.16 L-Arginin-uptake

Zur Messung der L-Arginin-Aufnahme in die Zelle wurden die präinkubierten konfluenten Zellen zunächst zweimal mit uptake-Puffer gewaschen und für 5 min mit $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]-L-Arg in uptake-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit eiskaltem uptake-Puffer gespült, um das restliche nicht aufgenommene [^3H]-L-Arg abzuwaschen. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Lysispuffers aufgebrochen, um den Inhalt zusammen mit Scintillatorflüssigkeit in einem Flüssigkeitsszintillationszähler zu messen. Zuvor wurde jedoch etwa $\frac{1}{4}$ der zu vermessenden Proben für eine Proteinbestimmung abgenommen. Die Messung des radioaktiv markierte L-Arginins erfolgte in einem WINSPECTRAL 1414 Liquid Scintillation Counter.

2.2.17 Immunhistochemie (ABC-Methode)

Die verschiedenen Hautbiopsien wurden den Patienten entnommen und in Formalin zur Untersuchung geschickt. Zum Schneiden der Proben wurden diese in Paraffin eingebettet. Dazu wurde zuvor über eine aufsteigende Alkoholreihe den Präparaten Wasser entzogen, um sie für das Paraffin zugänglich zu machen. Die Schnittdicke der Proben betrug 5 μm . Zur Fixierung wurden die Schnitte schließlich mit Poly-L-Lysin auf industriell beschichtete Objektträger geklebt und für mind. 1 h bei 60°C im Brutschrank inkubiert. Da in den folgenden Schritten im wässrigen Milieu gearbeitet wurde, mußten die Präparate zunächst wieder entparaffiniert werden. Dies erfolgte durch 2 \times 10 min baden in Xylol und anschließenden Bädern in einer absteigenden Alkoholreihe bis hin zum Rotisol (jeweils 2 \times 5 min). Es folgten verschiedenen Vorbehandlungen, um die Schnitte optimal für die Antikörperbedeckung vorzubereiten und unspezifische Bindungen zu blockieren. Als erstes die Neutralisierung der Erythrozyten mit einer 30-minütigen Inkubation eines Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisches (200 ml Methanol + 6 ml 30%iges Wasserstoffperoxid) bei RT. Dieses Gemisch wurde anschließend mit Aqua dest. wieder abgespült und die Präparate mit unterschiedlichen Behandlungen auf die Bindung des Antikörpers vorbereitet. Die erste Möglichkeit bietet eine Mikrowellenbehandlung. Hier wurden die Schnitte in 10 mM kalten Citratpuffer (pH 6) gestellt und darin bei 600 W 4 \times 5 min erhitzt, wobei nach jeder Phase wieder Puffer nachgefüllt wurde. Danach folgte eine Abkühlphase von 20 min und ein Waschschriff in TBS. Als nächstes ist ein Andauen mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen möglich. Dazu wurden die Präparate mit 0,1 % bzw. 0,001 % Trypsinlösung für 15 min bei 37°C inkubiert, danach mit Leitungswasser und TBS gespült und zur weiteren Behandlung in Coverplates und Sequenzerkammern eingespannt. Um die Bindung zu unspezifischen Eiweißen zu blockieren, folgte eine 15-minütige Inkubation mit 100 μl Normal-Pferde-Serum (1:10) und Milchpulver. Als nächstes wurden jeweils 100 μl des Primär-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100 dazugegeben und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS gespült. Als nächstes wurden die Proben mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-IgG, biotinyliert) versetzt, welcher die Brücke zum Avidin-Biotin-Komplex bildet, die wiederum die Anlagerung des Indikatorfarbstoffs AEC (Amino-Ethyl-Carbazol) erlaubt. Nach Zugabe des Brückenantikörpers wurde für 30 min bei RT inkubiert, mit

PBS der Avidin-Biotin-Komplex dazugeben (Vektor Elite ABC Kit; immer frisch 20 μ l Avidin + 1 ml PBS) und erneut für 30 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte die Färbung mit dem AEC-Farbstoff, der an den Avidin-Biotin-Komplex bindet. Wieder wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Zum Schluß folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (1:4 in Aqua dest. verdünnt) für ca. 10 s, um eine Kontraststeigerung zu erreichen, und schließlich die Eindeckelung der Objektträger mit Glyceringelatine (Mounting-Medium von DAKO).

2.2.18 Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate

Das Vorkommen, die Lokalisation, die Verteilung und die Dichte des Transportsystems des γ^+ -Transporters (hCat-1) innerhalb der immunhistochemisch angeführten Präparate wurde mittels eines halbquantitativen Scores subjektiv mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Olympus BH2-RFCA) bei 200facher Vergrößerung eingeschätzt. Bei der Bewertung wurde hierzu die Rot-Intensität des Indikatorfarbstoffs des eingesetzten Antikörpers als Anhaltspunkt genommen. Es wurden nur Präparate in die Auswertung einbezogen, die keine Schnittartefakte aufwiesen, bei denen das Präparat genügend verwertbares Material enthielt und die adäquat angeführt waren. Als interne Qualitätskontrolle der erfolgreichen Färbung wurden die Erythrozyten, die hCat-1 und -2 nicht exprimieren und somit nie eine Färbung zeigen, und das Endothel im Korium (K), welches immer die größte Farbintensität zeigen mußte, herangezogen.

Jede Gewebeprobe wurde in 10 einzelne Bildausschnitte (TAS) unterteilt, die unabhängig voneinander bewertet wurden. Jeder Ausschnitt wurde nochmals vertikal nach den interessierenden Strukturen in fünf Abschnitte unterteilt. Beurteilt wurde die Expression des γ^+ -Systems jeweils innerhalb des Endothels im Korium (K), des Stratum basale (StB), des unteren Anteils des Stratum spinosum (uStS), des oberen Anteils des Stratum spinosum (oStS) und innerhalb des Stratum granulosum (StG). Als Maß wurde das jeweils im Präparat "am stärksten angeführt vorkommende" Endothel genommen und mit dem Faktor 5 (100 %-76 %) beurteilt. Abstufend dazu wurde in "kräftige Färbung" (Faktor 4; 75 %-51 %), "deutliche Färbung" (Faktor 3; 50 %-26 %), "schwache Färbung" (Faktor 2; 25 %-1 %) und "keine Färbung" (Faktor 1; 0 %) unterschieden. Aus den 10 Werten pro Präparat und untersuchter Struktur wurde

jeweils der Mittelwert gebildet, um die Fehlerwahrscheinlichkeit dieser subjektiven, visuellen Bewertungsmethode zu minimieren.

2.2.19 Statistik

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat für Windows. Zur Analyse von drei und mehr Stichproben (Behandlungsgruppen) aus normalverteilten Populationen mit gleicher Varianz wurde die Varianzanalyse angewandt. Da dabei lediglich ein Faktor in den unterschiedlichen Mittelwertgruppen untersucht wurde, kam die einfache Varianzanalyse (one-way-ANOVA) zur Anwendung. Hierbei wurden Zufallsstichproben mit unbekannter gemeinsamer Varianz untersucht. Zum Vergleich von drei oder mehreren Gruppen mit Bezug auf eine Kontrolle wurde der Bonferroni T-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression des γ^+ -Systems in Keratinozyten und HDMEC

3.1.1 Nachweis auf RNA-Ebene

Zum Nachweis der Transkription des γ^+ -Systems in kutanen Zellen, wurden Primer aus bereits veröffentlichten cDNA-Sequenzen der γ^+ -Systemgene designiert (Anhang) und über die Firma Metabion hergestellt. Die Primer wurden anschließend in die unter 2.2.10.1 beschriebene PCR mit cDNA aus den drei Zelltypen (HaCaT, NHEK und HDMEC) eingesetzt.

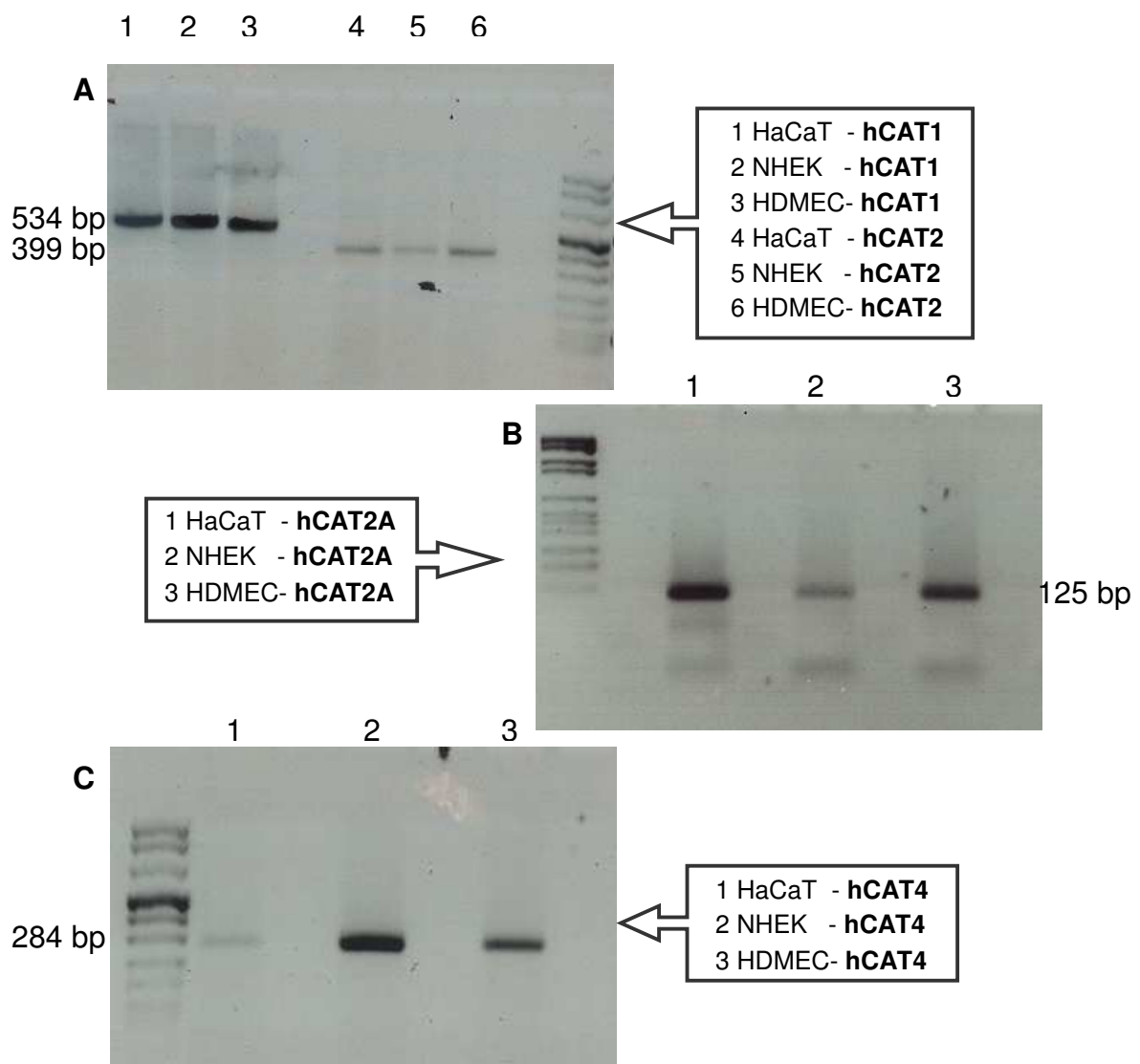


Abbildung 3.1-1 Nachweis des γ^+ -Systems über RT-PCR mit hCAT-1; -2-; 2A und 4-spezifische Primern.

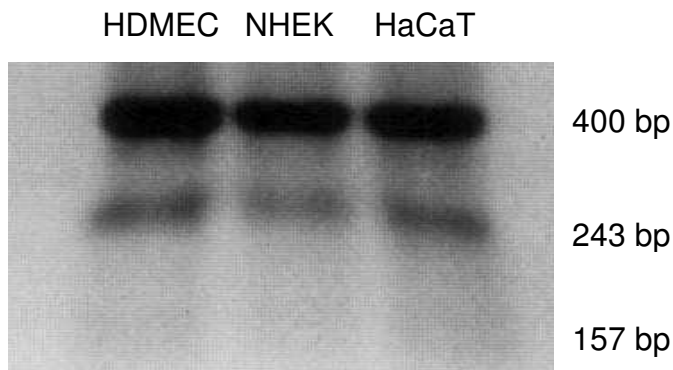


Abbildung 3.1-2 Nachweis der hCAT2b-Isoform über einen BamHI-Verdau des 400 bp hCAT2 PCR-Produktes.

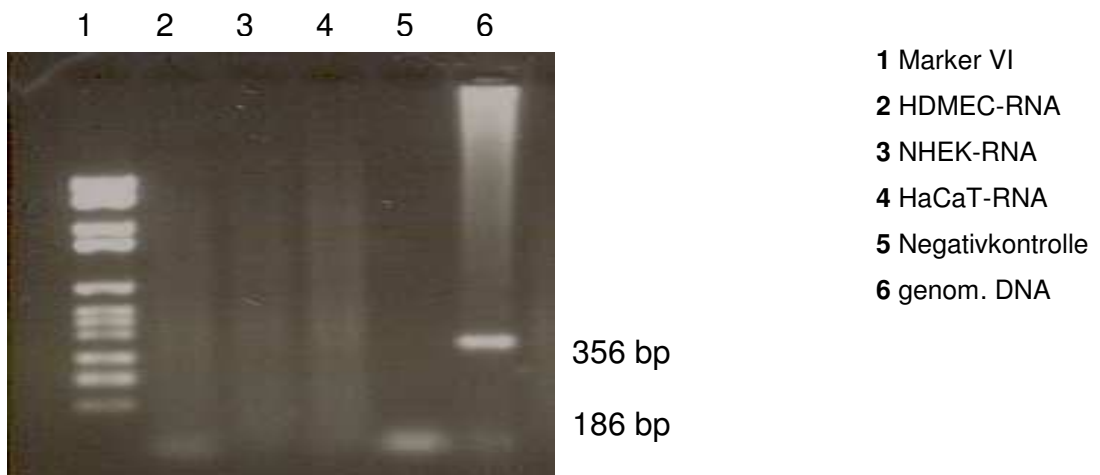


Abbildung 3.1-3 Nachweis von hCAT3 über eine RT-PCR.

Die amplifizierten Fragmente wurden in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt und über eine Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei zeigten sich für die Gene hCAT1, 2, 2A und 4 DNA-Fragmente in der zu erwartenden Größe (Abbildung 3.1-1). Dagegen konnte weder in Keratinozyten (NHEK, HaCaT) noch in HDMEC für hCAT3 ein Fragment amplifiziert werden (Abbildung 3.1-3). Zur Validierung dieser Aussage wurde als Positivkontrolle genomische DNA denselben Bedingungen (Primer, Zyklusprogramm usw.) unterworfen und dort ein Nukleinsäure-Abschnitt für hCAT3 nachgewiesen. Die erhaltenen Banden wurden schließlich aus dem Agarosegel ausgeschnitten, eluiert und sequenziert. Bei einem Abgleich der Sequenzdaten mit bereits bekannten Gensequenzen aus der Datenbank von NCBI konnte mit einer Homologie von etwa 95 % eine Zuordnung der jeweiligen Amplifikate zu hCAT1, hCAT2, hCAT2A, hCAT2B und hCAT4 erfolgen. Somit kann

davon ausgegangen werden, daß die designten Primer ausschließlich die gewünschten Genstücke amplifizieren.

Der Nachweis der hCAT2b-Isoform erfolgte zunächst über einen BamHI-Verdau des hCAT2-Amplifikates. Die Primer wurden hierfür so gewählt, daß sie eine Region flankieren, in der hCAT2a und 2b innerhalb eines 125 bp großen Bereiches nicht homolog sind. Dieser nichthomologe Bereich schließt eine BamHI-Schnittstelle für hCAT2b, jedoch nicht für hCAT2a ein. Über den Nachweis der BamHI-Schnittstelle mit einem BamHI-Verdau war somit indirekt auch der Nachweis der hCAT2b-Isoform möglich (Abbildung 3.1-2).

3.1.2 Nachweis auf Proteinebene

Der Nachweis der Proteine hCAT1, 2 und 4 erfolgte mittels immunhistologischer Färbung (2.2.17) von pathologisch unauffälligen Hautpräparaten mit spezifischen hCAT-Antikörpern. Zusätzlich wurden die Antikörper zum Nachweis auch in einem Western Blot eingesetzt. Bei dem jedoch nur ein Nachweis von hCAT1 und 4 möglich war. Für die Darstellung des Proteinnachweises wurden hier nur die Bilder der immunhistologischen Färbung ausgewählt.

Um die einzelnen Färbungen vergleichbar zu machen, wurde die eingesetzte Methode jeweils in einer Antikörper-Verdünnung von 1:100 durchgeführt. Die Färbung der Hautpräparate mit dem hCAT1-Antikörper zeigen im Querschnitt durch die Epidermis eine besonders starke Färbung im Bereich des Stratum basale und im Stratum granulosum. In der Vergrößerung (Abbildung 3.1-4 A) wird der Unterschied der Färbung der Zellen im Stratum spinosum zu denen im Stratum basale deutlich. Ausschnitt B, der Querschnitt von Gefäßzellen, zeigt eine starke Färbung auch der vaskulären und perivaskulären Zellen. Die Erythrozyten zeigen dagegen keine Expression des Proteins. Bei der Lokalisierung der hCAT2 und 4-Proteine, zeigte sich vor allem eine Anfärbung im Stratum granulosum, die jedoch im Vergleich zur hCAT1-Färbung wesentlich schwächer ausfiel.

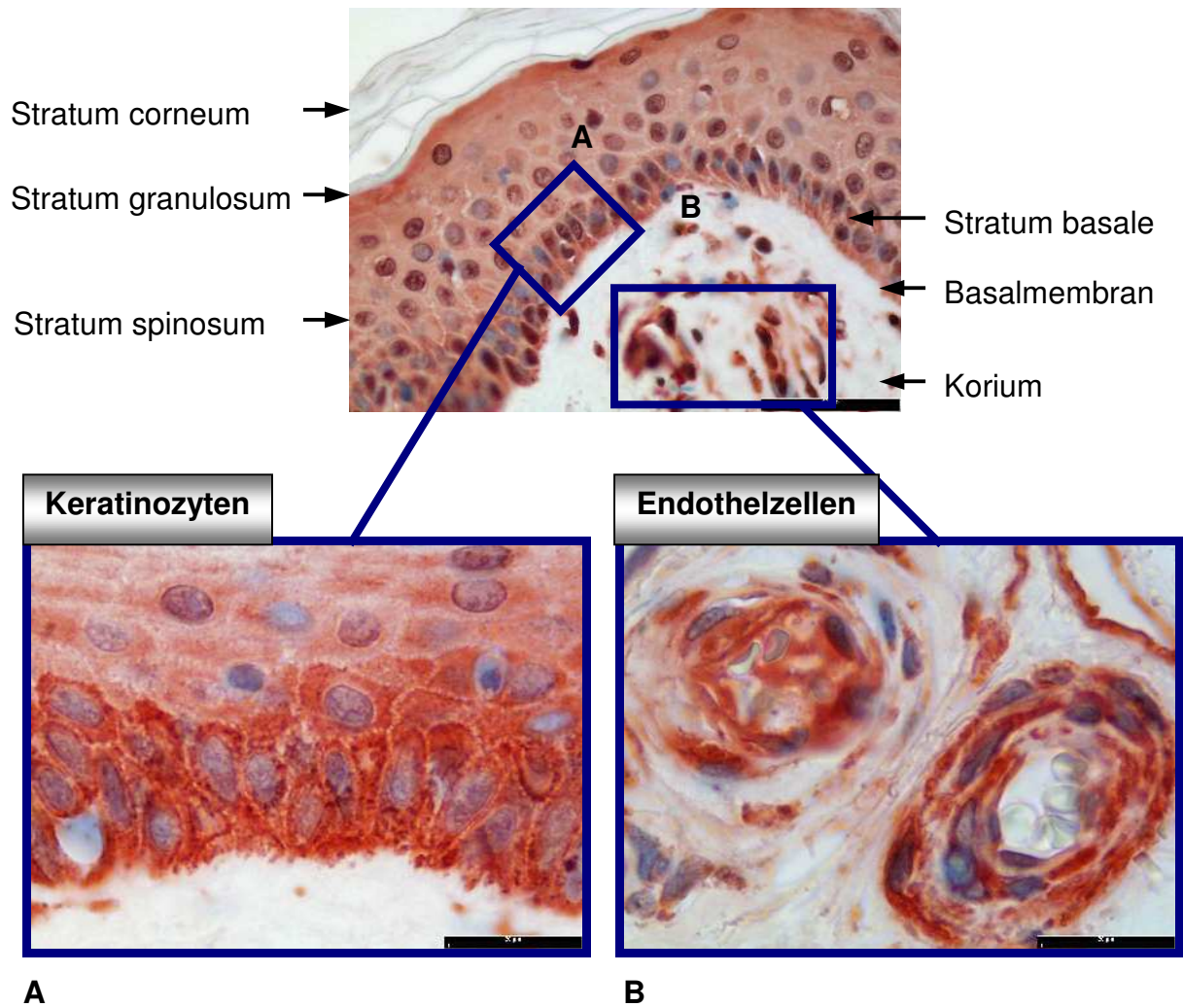


Abbildung 3.1-4 Immunhistochemische Färbung gesunder Probanden-Haut mit hCAT1-Antikörper A) zeigt deutlich eine Färbung im Stratum germinativum. B) weist hCAT1 in perivaskulären Zellen nach.

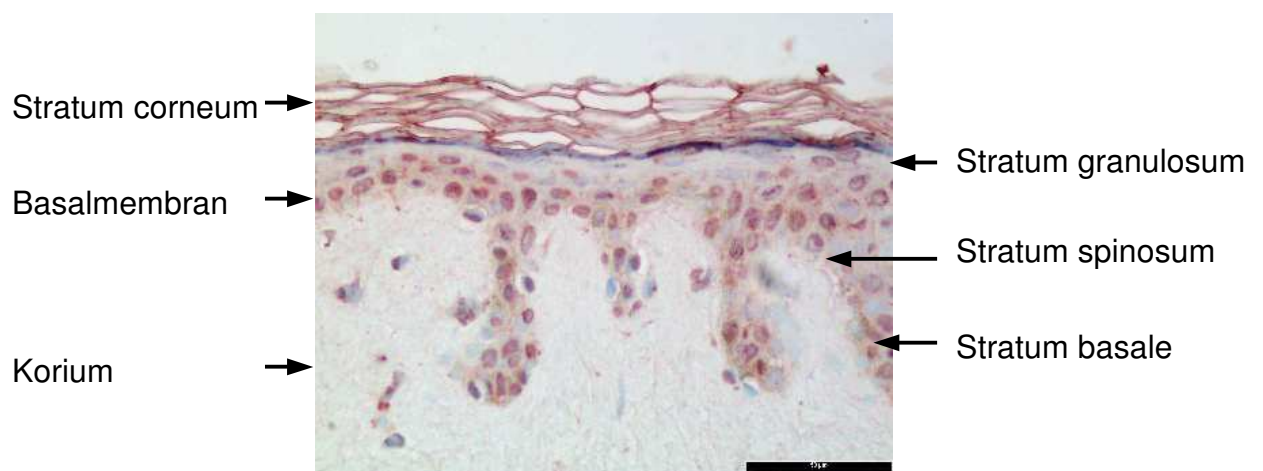


Abbildung 3.1-5 Histochemische Färbung humaner Haut mit einem spezifischen Antikörper gegen hCAT2.

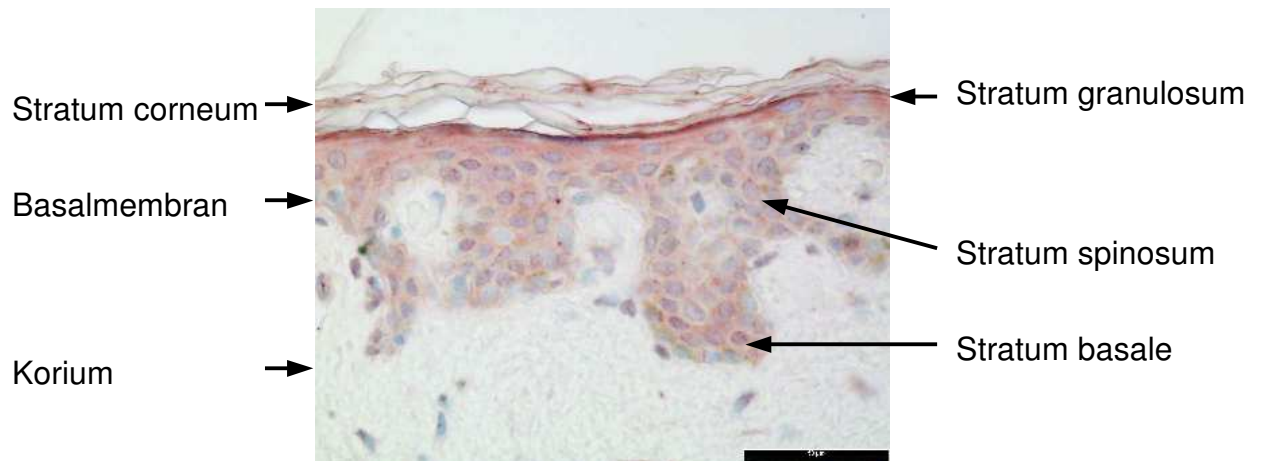


Abbildung 3.1-6 Lokalisation des hCAT4-Proteins in humaner Haut.

3.2 Untersuchungen zur Expressionsstärke der γ^+ -Transportergene

Zum Nachweis der γ^+ -Transporter-Gene wurden je drei unabhängige Experimente durchgeführt. Dabei zeigte sich nach visueller Betrachtung (Abbildung 3.1-1) eine scheinbar unterschiedliche Expressionsstärke der einzelnen Gene zueinander und innerhalb der drei Zelltypen (HaCaT, NHEK und HDMEC). Um dies zu überprüfen und um die Expressionsstärke quantifizieren zu können, wurde zusätzlich eine PCR unter Real-Time-Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß hCAT1 in allen drei Zelltypen etwa 10-140 mal stärker als hCAT2 und 4 exprimiert wird (Abbildung 3.2-1). Eine besonders starke Expression zeigt sich bei der immortalisierten HaCaT-Zelllinie. Hier ist die hCAT1-Expression etwa 3-5 mal so stark wie in den nativen Zelltypen. In nativen Keratinozyten wird hCAT1 immerhin noch 2 mal mehr transkribiert als in mikrovaskulären Endothelzellen. Die mRNA der Gene hCAT2b und 4 wird in HaCaT zu gleichen Teilen synthetisiert und in nativen Keratinozyten hCAT4 etwa 10 mal mehr als hCAT2b. In mikrovaskulären Endothelzellen liegt die Wichtung der Synthese genau invers. Hier wird hCAT2b 10 mal stärker als hCAT4 exprimiert.

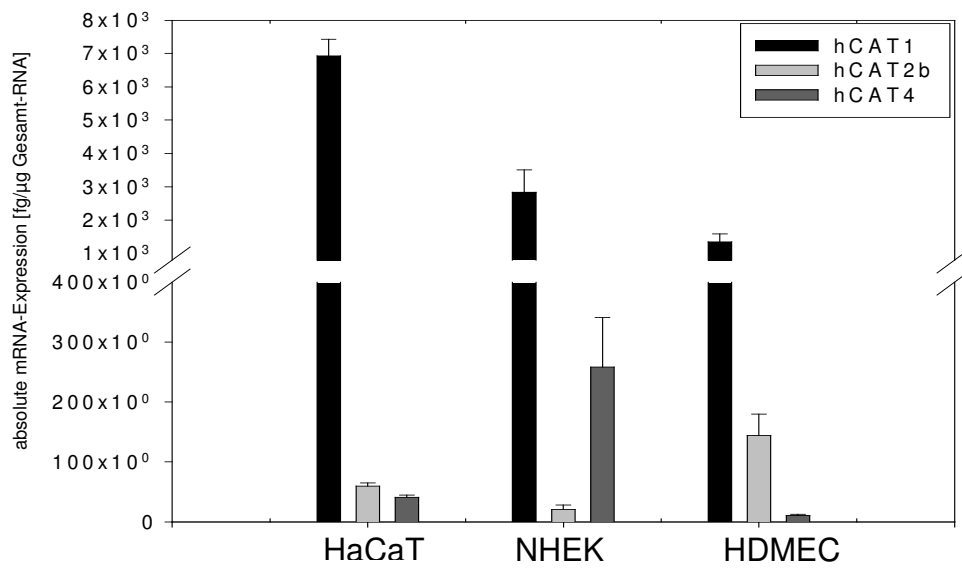


Abbildung 3.2-1 Quantitative Auswertung der hCAT-Genexpression über Real-Time-PCR.

Die Untersuchungen zur Bestimmung des Verhältnisses von hCAT2A zu 2B zeigen, dass hCAT2B etwa 2mal mehr in den Zellen exprimiert wird als die Splicevariante 2A.

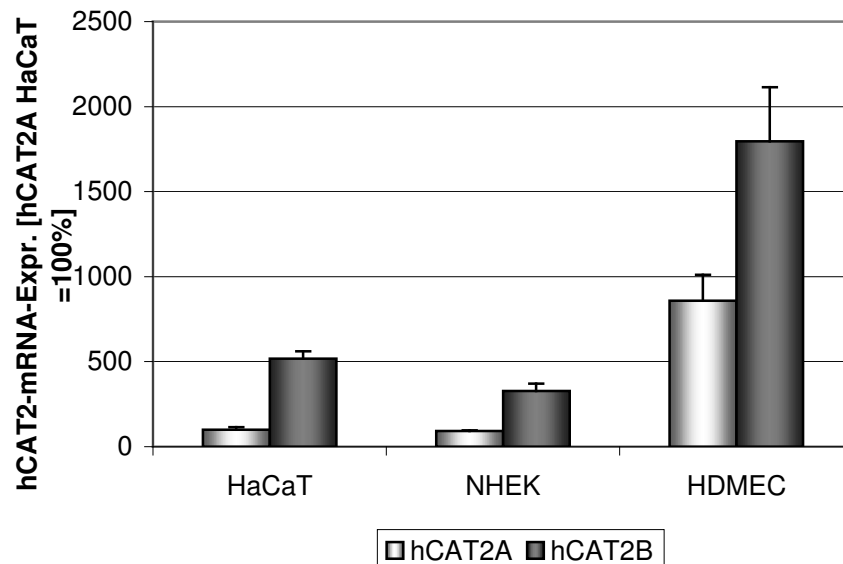


Abbildung 3.2-2 Quantifizierung des Verhältnisses der hCAT2A-mRNA-Expression zu 2B. hCAT2A in HaCaT wurde gleich 100% gesetzt.

3.3 Untersuchungen zur in vitro Zytotoxizität

Um sicherzustellen, daß die verwendeten kationischen Aminosäuren und TH1-Zytokine in einem nicht zytotoxischen Bereich eingesetzt wurden, erfolgte für alle Wirkstoffe zuvor ein Test mit der unter 2.2.5 beschriebenen Methode. Die Untersuchungsparameter (Zeit, Konzentration) wurden so gewählt, daß sie sich in einem für spätere Versuche relevanten Bereich befinden.

3.3.1 Toxizität von L-Arginin-Hydrochlorid in NHEK

Nach 24 h zeigte sich im Vitalitätstest bis zur maximal applizierten Konzentration von 50 mM L-Arginin-Hydrochlorid kein Effekt auf die Lebensfähigkeit der NHEK. Erst nach 48 h ab einer Konzentration von 25 mM wirkt L-Arginin-HCl auf native Keratinozyten zytotoxisch. Dieser Befund zeigt sich durch eine 50%ige Abnahme der vitalen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Effekt wird konzentrationsabhängig (bei 50 mM) und zeitabhängig (nach 24 h bei 25 mM) verstärkt bis zu einer Abnahme der vitalen Zellen auf 20 % .

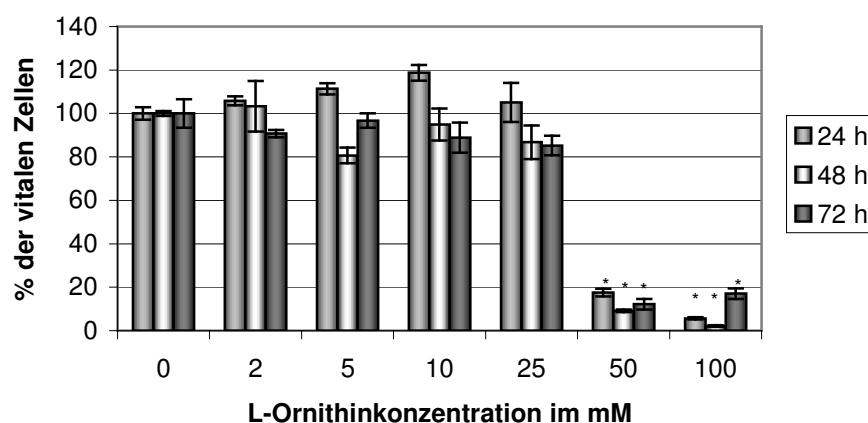


Abbildung 3.3-1 Prozentualer Anteil vitaler nativer Keratinozyten nach Applikation verschiedener Konzentrationen L-Arginin-Monohydrochlorid (0,5; 2; 5; 10; 15; 25 und 50 mM) nach 24 h; 48 h bzw. 72 h Einwirkung (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; $p < 0,05$; $n = 6$). Kontrolle gleich 100%.

3.3.2 Toxizität von L-Ornithin-Hydrochlorid in NHEK

Bei der Applikation von L-Ornithin-Hydrochlorid auf NHEK zeigt sich durch die Abnahme der adhärennten Zellen auf unter 20 % ab 50 mM bereits nach 24 h ein deutlich zytotoxischer Effekt, der dem Ausmaß nach 48 h und 72 h entsprach.

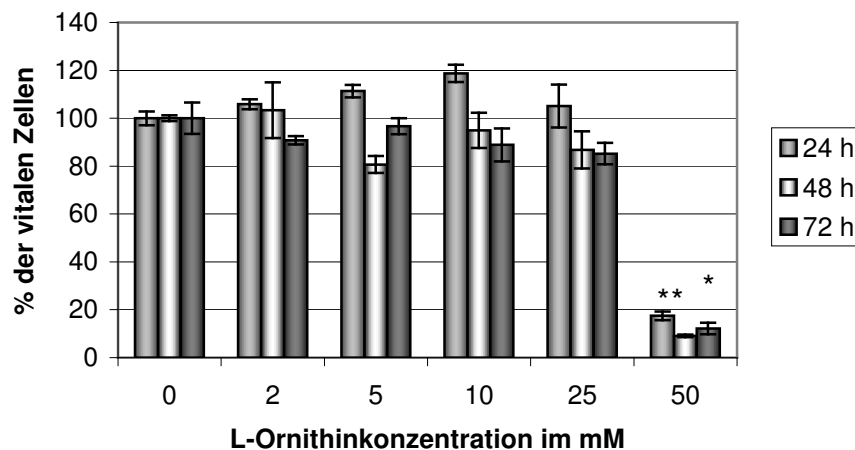


Abbildung 3.3-2 Prozentualer Anteil vitaler nativer Keratinozyten nach Applikation verschiedener Konzentrationen L-Ornithin-Monohydrochlorid (0,5; 2; 5; 10; 25 und 50; 100 mM) nach 24 h; 48 h bzw. 72 h Inkubation (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; $p < 0,05$; $n = 6$).

3.3.3 Toxizität von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ in NHEK

Nach 24-stündiger Inkubation der NHEK mit einem Cocktail aus je 250-2000 U/ml $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ konnte nur ein geringer Abfall, etwa 10 – 15 %, der vitalen Zellen ab 1000 U/ml festgestellt werden. Nach weiteren 24 h sind schon ab 250 U/ml etwa 30 % der Zellen tot. Erst ab 2000 U/ml sinkt die Zahl der vitalen Zellen um weitere 30 %.

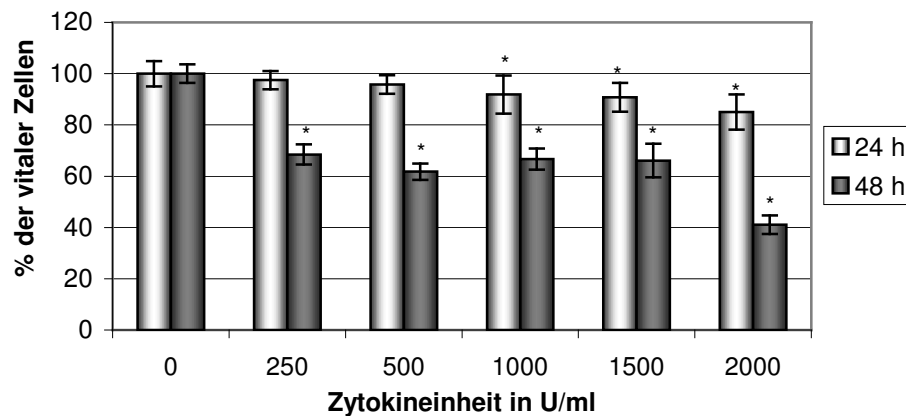


Abbildung 3.3-3 Prozentualer Anteil vitaler nativer Keratinozyten nach Applikation verschiedener Konzentrationen des TH1-Zytokincocktails (0; 250; 500; 1000; 1500 und 2000 U/ml) nach 24 h bzw. 48 h Inkubation (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; $p < 0,05$; $n = 8$).

3.3.4 Toxizität von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ in HDMEC

Die mikrovaskulären Endothelzellen reagieren recht unempfindlich auf die Gabe des TH1-Zytokincocktails. Hier zeigt sich zwar schon nach 24 h ab 800 U/ml ein geringer Abfall der vitalen Zellen von etwa 10 %, dieser Wert wird allerdings weder durch eine längere Inkubationszeit noch durch höhere Konzentrationen wesentlich überschritten.

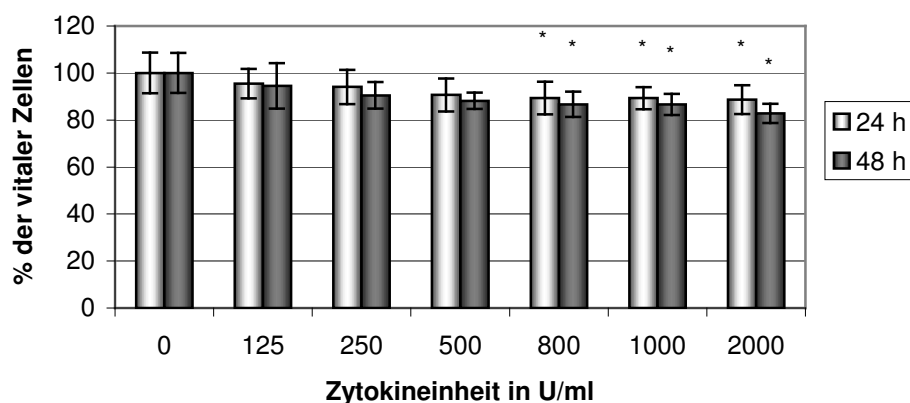


Abbildung 3.3-4 Prozentualer Anteil vitaler mikrovaskulärer Endothelzellen nach Applikation verschiedener Konzentrationen des TH1-Zytokincocktails (0; 125; 250; 500; 800; 1000 und 2000 U/ml) nach 24 h bzw. 48 h Inkubation (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; $p < 0,05$; $n = 6$).

3.4 Regulation des γ^+ -Systems durch kationische Aminosäuren in NHEK

Das γ^+ -System transportiert Na^+ - und pH-unabhängig die L-chiralen Formen der kationischen Aminosäuren Arginin, Ornithin und Lysin. Da aus dermatotherapeutischer Sicht die Verfügbarkeit vor allem der Aminosäuren L-Arginin und L-Ornithin interessant erscheint, sollten die folgenden Untersuchungen Aufschluß darüber geben, ob diese Substanzen einen transkriptionellen bzw. translationellen Einfluß auf ihren Transporter haben und somit ihre Bereitstellung in der Zelle selber mitregulieren. Die Untersuchung zur transkriptionellen Beeinflussung wurden mit der unter 2.2.10.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Methode 2.2.15 diente zur Bewertung der Proteinsynthese des γ^+ -Systems unter L-Arginin-HCl- bzw. L-Ornithin-HCl-Einfluss. Für das hCAT2-Protein konnte keine Auswertung gemacht werden, da die Expression des Proteins offenbar sehr gering ist und über die Methode der Western Blot Analyse nicht nachweisbar war.

3.4.1 Einfluß von L-Arginin auf die RNA-Expression

Über einen Zeitverlauf von 24 bis 48 h zeigt sich keine signifikante Veränderung der hCAT1-Expression durch die Gabe von L-Arginin-HCl. Erst nach 72-stündiger Inkubation mit 15 mM L-Arginin-HCl konnte die Expression des Gens um 70 % gesteigert werden (Abbildung 3.4-1).

Die Expression von hCAT2b konnte nach 24 h durch L-Arg-HCl angeregt werden. Hier kommt es bei der Gabe von 2 mM zu einem Anstieg auf 150 %. Bei Betrachtung des gesamten Verlaufs ist jedoch eher ein Abfall zu beobachten, der sowohl zeitlich (ab 72 h), als auch konzentrationsabhängig (ab 15 mM) zu beobachten ist (Abbildung 3.4-2).

Die hCAT4-Expression wird durch die L-Chirale Form von Arg-HCL ausschließlich negativ beeinflusst. Bei 15 mM 24 h kommt es zu einer 50 % geringeren Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welche noch stärker nach 48 h und 72 h, zu beobachten ist. Nach 72-stündiger Inkubation mit der Aminosäure kommt es schon bei 10 mM zu einer Abnahme in der Syntheseleistung der hCAT4-mRNA.

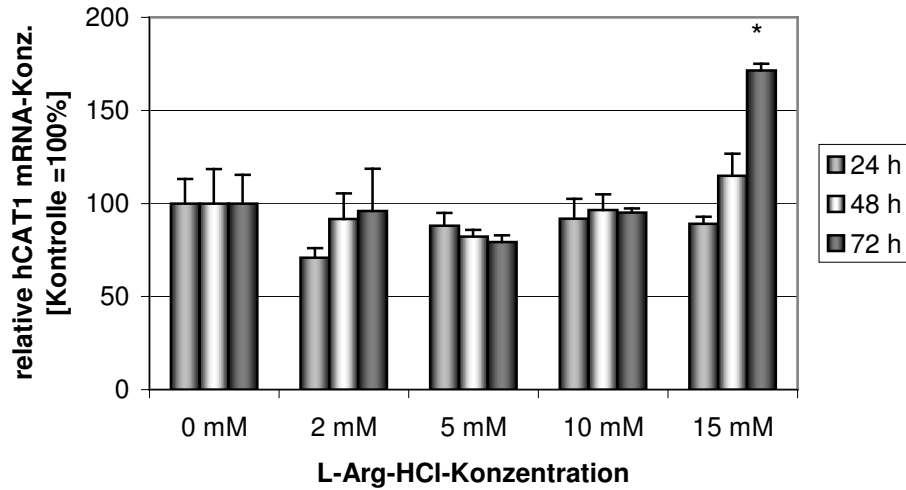


Abbildung 3.4-1 Quantitative Bestimmung der hCAT1-mRNA-Expression nach L-Arginin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

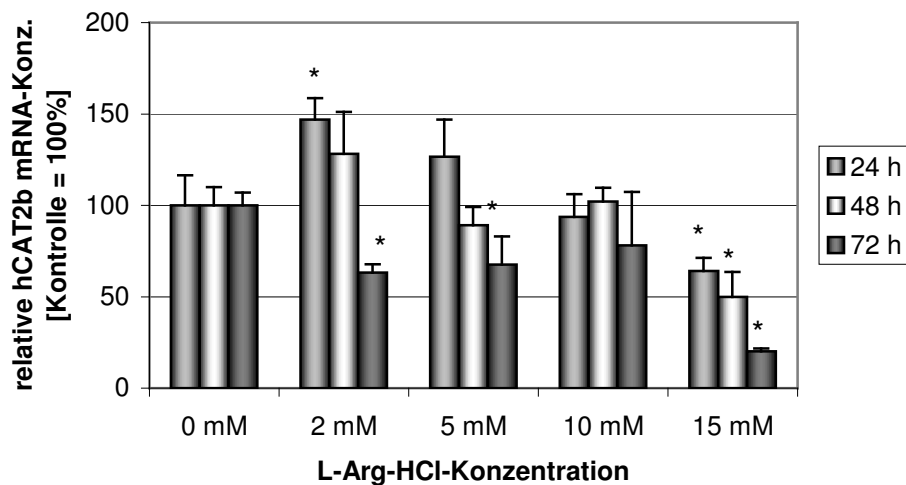


Abbildung 3.4-2 Quantitative Bestimmung der hCAT2b-mRNA-Expression nach L-Arginin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

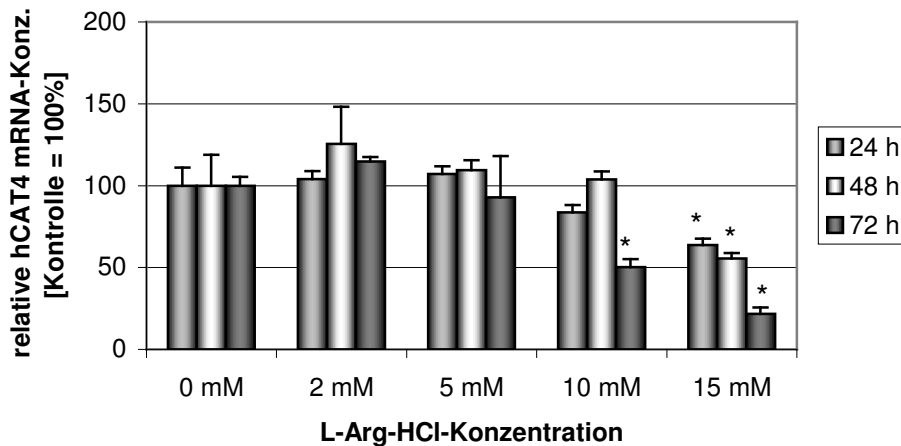


Abbildung 3.4-3 Quantitative Bestimmung der hCAT4-mRNA-Expression nach L-Arginin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle)

3.4.2 Einfluß von L-Arginin auf die Proteinbiosynthese

Auch auf Proteinebene hat L-Arginin-HCl ausschließlich nach 72 h bei 15 mM eine Wirkung auf hCAT1. Die Proteinssynthese wird hier um etwa das 4 fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigert (Abbildung 3.4-5). Für hCAT4 zeigt sich exklusiv nach 48 h bei 2 mM eine Abnahme der Translationsleistung auf 40 % zum Kontrollwert. Für hCAT4 konnte nach 72 h keine Auswertung der Proteinsynthese erfolgen, da hier die Expression zu schwach ist, um eine eindeutige Zuordnung der spezifischen Bande im Western Blot machen zu können.

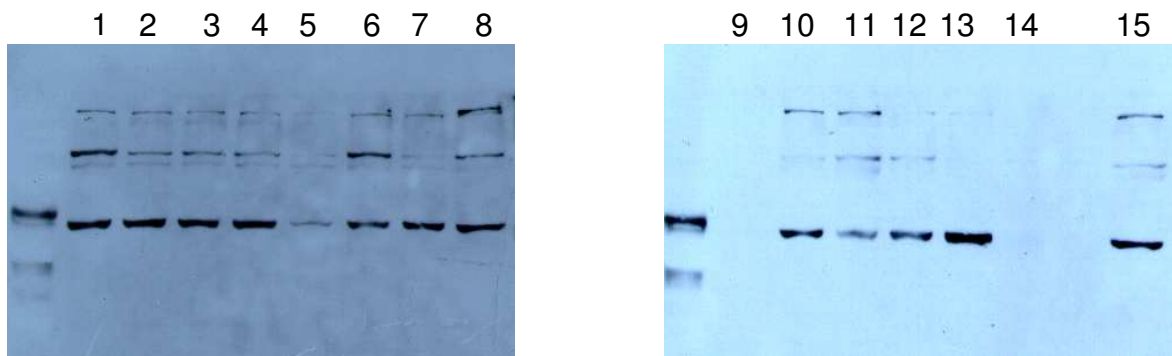


Abbildung 3.4-4 Röntgenfilm von elektrophoretisch aufgetrennten und markierten hCAT1-Protein in NHEK nach L-Arginin-Applikation als Bsp. eines Western Blots.

1 Kontrolle 24 h	5 45 mM 24 h	9 25 mM 48 h	13 15 mM 72 h
2 5 mM 24 h	6 Kontrolle 48 h	10 15 mM 48 h	14 25 mM 72 h
3 15 mM 24 h	7 5 mM 48 h	11 Kontrolle 72 h	15 Kontrolle 24 h
4 25 mM 24h	8 Kontrolle 24 h	12 5 mM 72h	

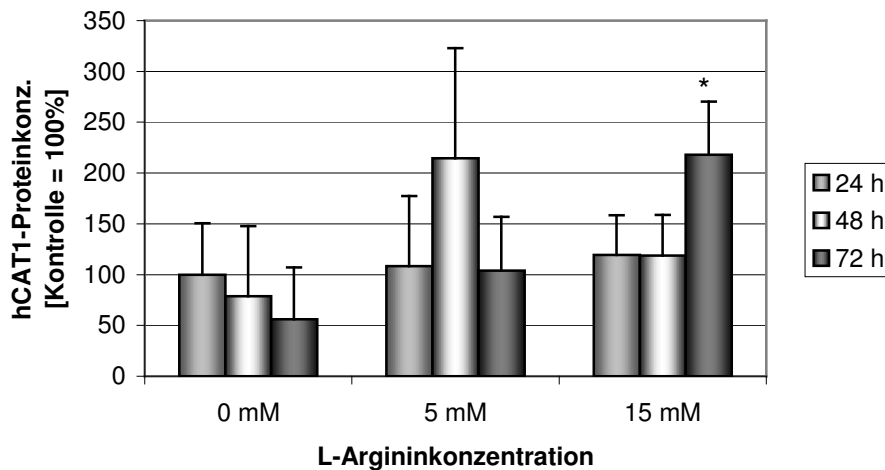


Abbildung 3.4-5 Semiquantitative Auswertung der hCAT1-Protein-Expression nach L-Arginin-Applikation. Die Werte wurden auf die Kontrolle 24 h bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur Kontrolle 24 h).

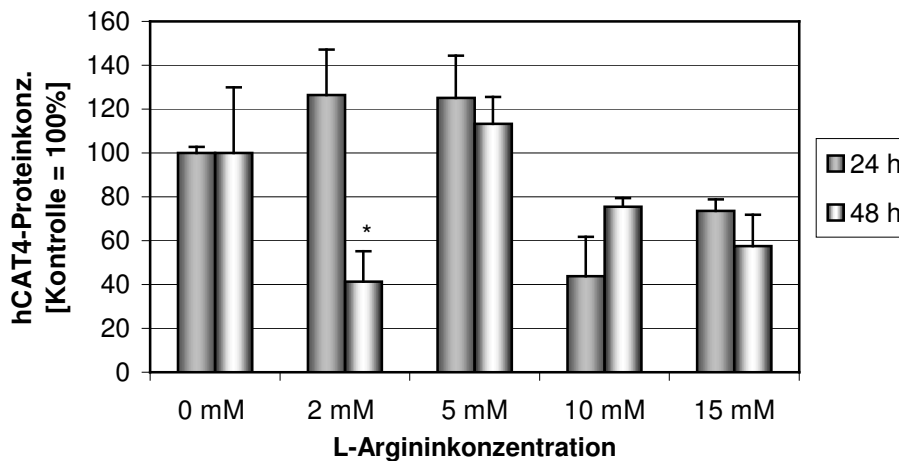


Abbildung 3.4-6 Semiquantitative Auswertung der hCAT4-Protein-Expression nach L-Arginin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

3.4.3 Einfluß von L-Ornithin auf die RNA-Expression

Bei der Zugabe von L-Ornithin-HCl konnte über einen Zeitverlauf von 6 h bis 72 h ausschließlich bei 2 mM 48 h ein geringer Abfall in der RNA-Expression von hCAT1 beobachtet werden, sonst konnten keine Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3.4-7). Die Untersuchungen von hCAT2b und 4 zeigten wesentlich stärkere Effekte. So zeigte sich nach 24-

72stündiger Inkubation mit 5 mM der Aminosäure eine Steigerung der hCAT2b mRNA-Expression von 100 % - 150 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.4-8). Auch für hCAT4 war eine Steigerung um etwa 120 % ermittelbar. Dieser Effekt wurde durch den Zusatz von 10 mM L-Ornithin nach 48 h erreicht und konnte nach 72 h sogar auf 200 % gesteigert werden (Abbildung 3.4-9).

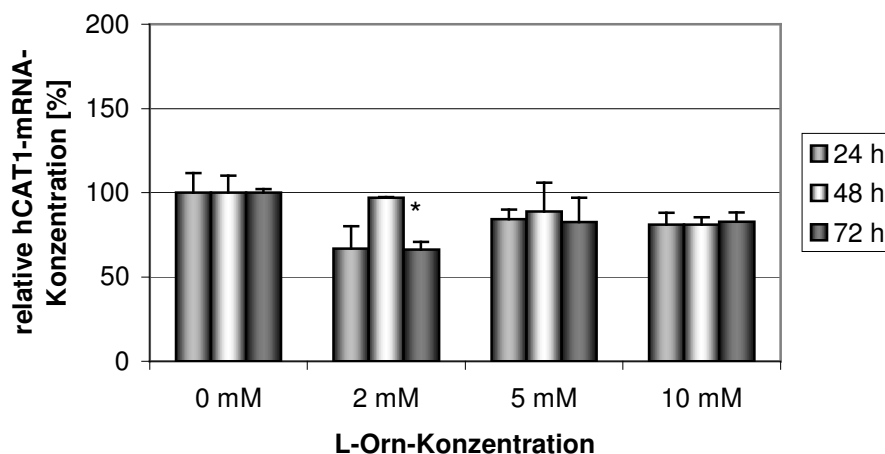


Abbildung 3.4-7 Quantitative Auswertung der hCAT1-mRNA-Expression nach L-Ornithin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

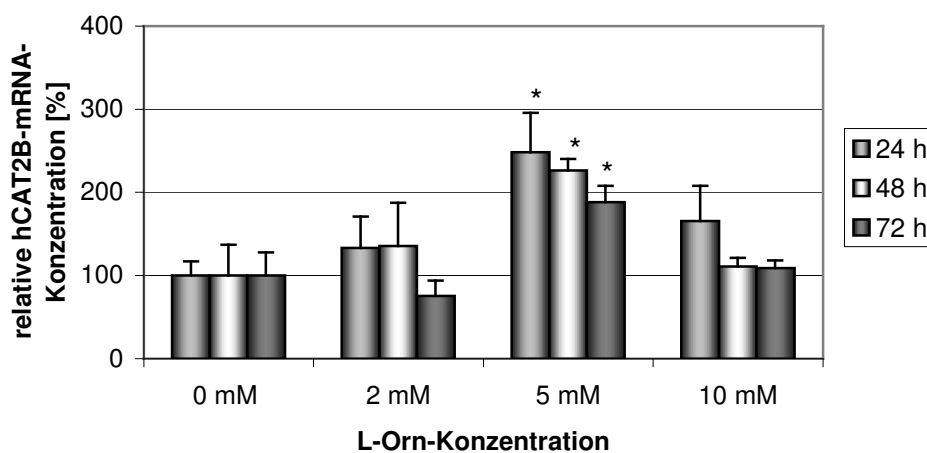


Abbildung 3.4-8 Quantitative Auswertung der hCAT2b-mRNA-Expression nach L-Ornithin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

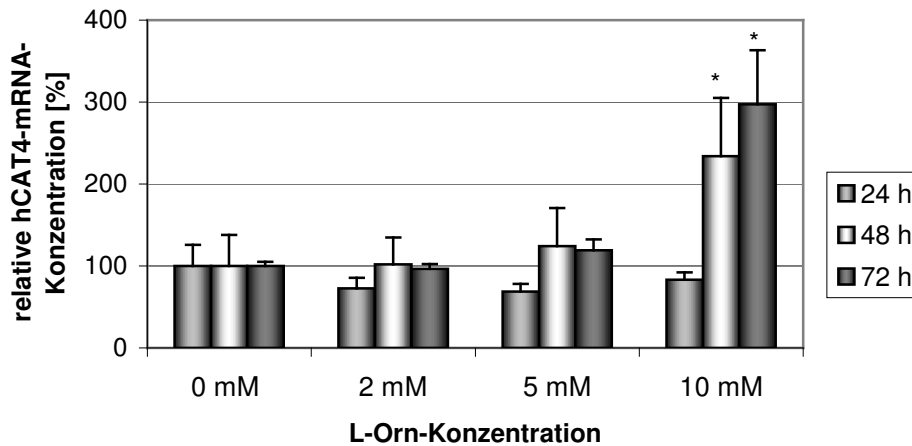


Abbildung 3.4-9 Quantitative Auswertung der hCAT4-mRNA-Expression nach L-Ornithin-Applikation. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle)

3.4.4 Einfluß von L-Ornithin auf die Proteinbiosynthese

Insgesamt scheint L-Ornithin eher einen negativen Einfluß auf die Proteinexpression des γ^+ -Systems zu besitzen. So zeigte sich für hCAT1 ab 48 h bei unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen ein Abfall der spezifischen Proteinsynthese (Abbildung 3.4-10). Auch für das hCAT4-Protein war nach 48 h ein Absinken der Syntheseleistung zu verzeichnen. Lediglich nach 72 h bei einer Konzentration von 10 mM L-Ornithin kam es zu einem geringen Anstieg in der Proteinexpression (Abbildung 3.4-11).

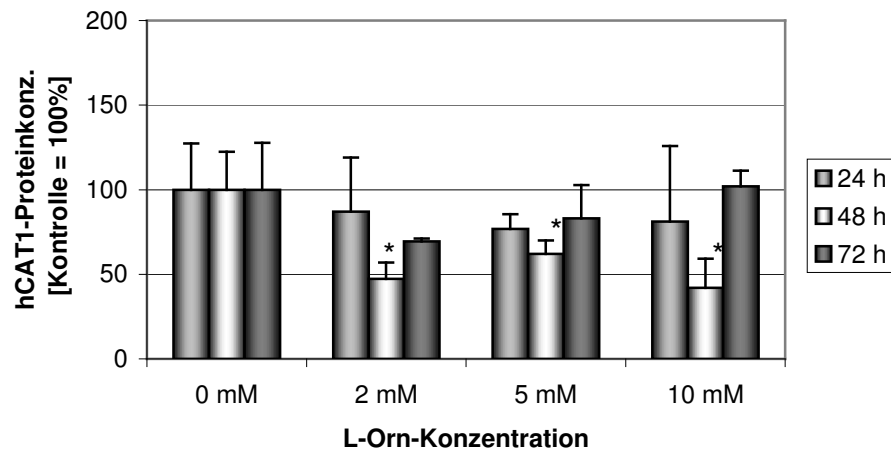


Abbildung 3.4-10 Semiquantitative Auswertung der hCAT1-Protein-Expression nach L-Ornithin-Applikation. Die Werte wurden auf die Kontrolle 24 h bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur Kontrolle 24 h).

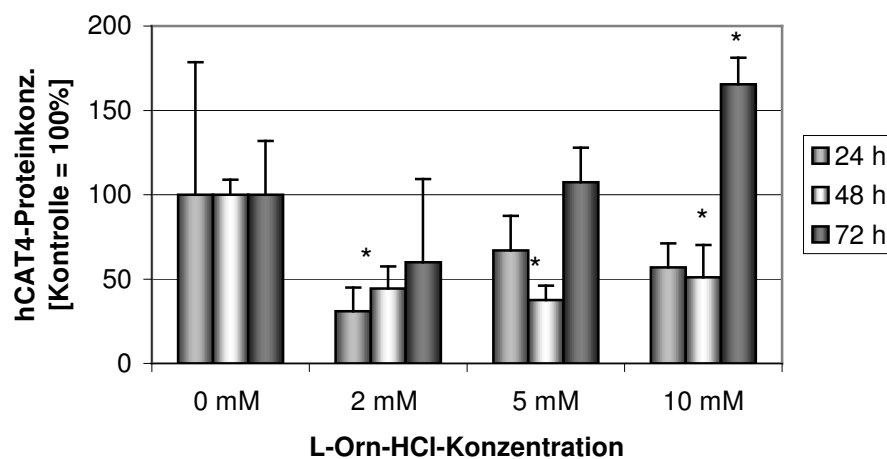


Abbildung 3.4-11 Semiquantitative Auswertung der hCAT4-Protein-Expression nach L-Ornithin-Applikation. Die Werte wurden auf die Kontrolle 24 h bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur Kontrolle 24 h).

3.5 Regulation des γ^+ -Systems durch TH1-Zytokine

Vor allem spielen die mikrovaskulären Endothelzellen eine bedeutende Rolle in inflammatorischen Prozessen. Die TH1-Zytokine sind vor allem bei Psoriasispatienten hochreguliert und lösen hier verschiedene inflammatorische Reaktionen aus, die sich z.T. als Symptomatik der Psoriasis äußern. Die durchgeführten Untersuchungen sollten klären, inwieweit das γ^+ -System durch die Zytokine beeinflusst werden kann und somit an der Krankheitssymptomatik beteiligt sein könnte.

3.5.1 Einfluß der Zytokine auf die mRNA-Expression des γ^+ -Systems in HDMEC

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden mit einem Zytokincocktail von jeweils 500 U/ml bzw. 800 U/ml $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ 24 h und 48 h inkubiert, um anschließend über Real-Time-PCR die Expression der einzelnen γ^+ -Transportergene zu untersuchen. Es zeigte sich, daß die mRNA-Synthese von hCAT1 und 4 etwa im gleichen Maße anstieg. Es war jeweils ein gleichmäßiger Anstieg über Zeit und Konzentration zu sehen, der nach 48 h bei der Gabe von je 800 U/ml am größten war (Abbildung 3.5-1; Abbildung 3.5-4). Für hCAT2A und B zeigte sich ein wesentlich deutlicheres Ergebnis. Hier war nach 24 h schon ein Anstieg auf das etwa 10-35fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu verzeichnen. Nach 48 h sankt dieser Wert etwas ab, betrug allerdings immer noch mehr als das 20fache des Kontrollwertes (Abbildung 3.5-2; Abbildung 3.5-3). Zusätzlich wurde die Expression des Gens hCAT3 untersucht, jedoch zeigte sich auch nach Zugabe der genannten Zytokinkonzentration zu den angegebenen Zeiten keine Expression des hCAT3-Transkriptes (Daten werden nicht gezeigt).

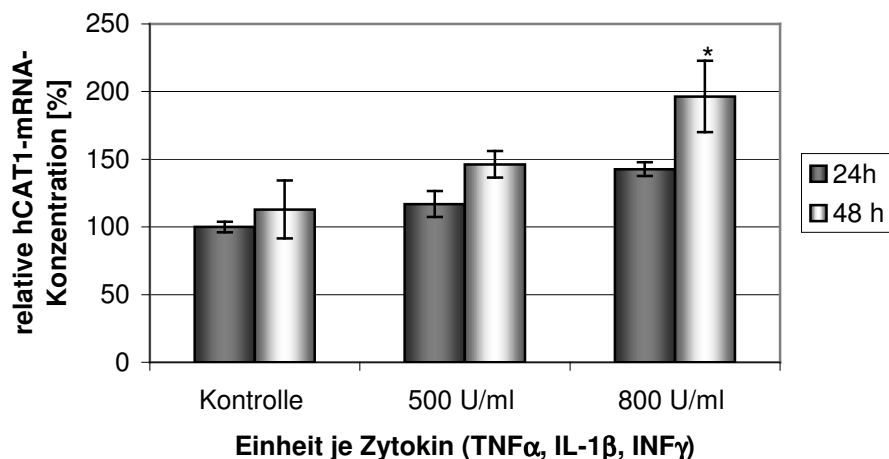


Abbildung 3.5-1 Quantitative Auswertung der hCAT1-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 800 U/ml TNF α , IL-1 β und INF γ . Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

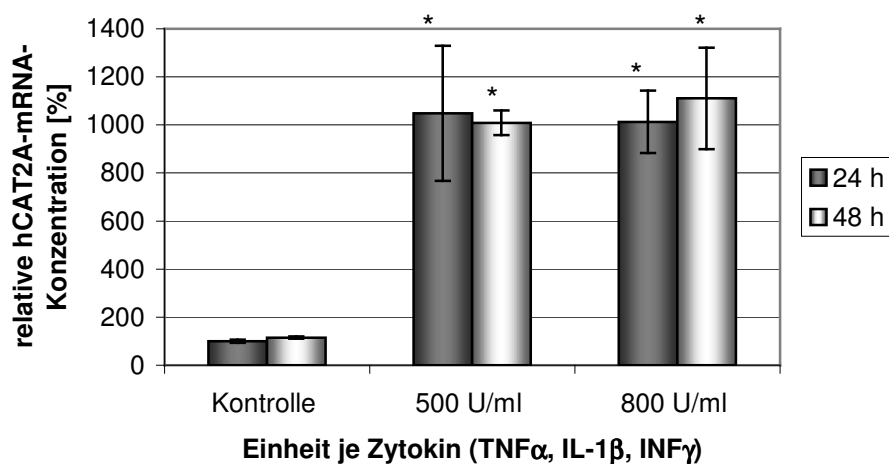


Abbildung 3.5-2 Quantitative Auswertung der hCAT2a-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 800 U/ml TNF α , IL-1 β und INF γ . Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

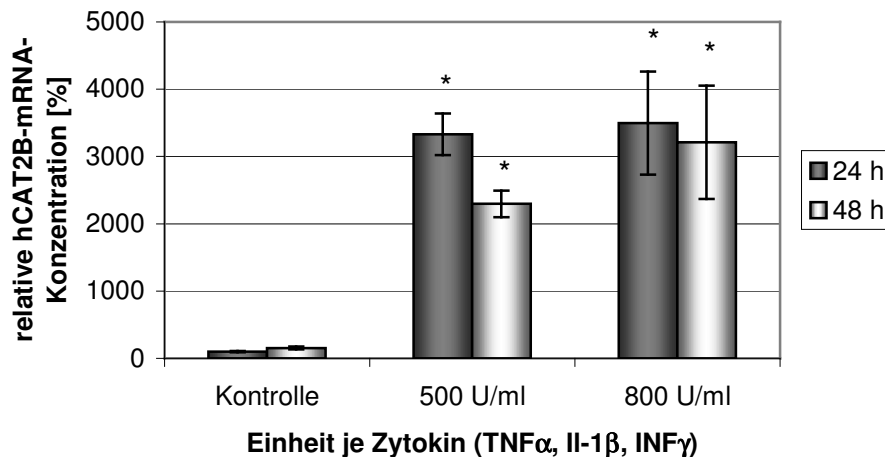


Abbildung 3.5-3 Quantitative Auswertung der hCAT2b-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 800 U/ml TNF α , IL-1 β und INF γ . Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

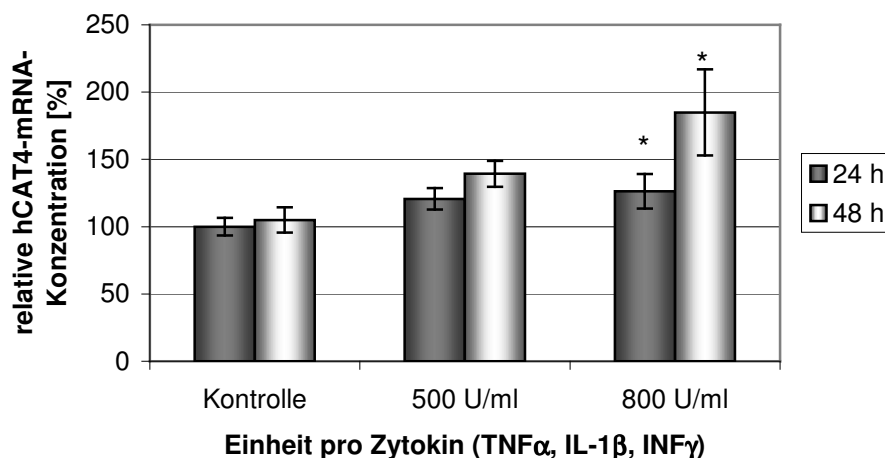


Abbildung 3.5-4 Quantitative Auswertung der hCAT4-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 800 U/ml TNF α , IL-1 β und INF γ . Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

Vergleicht man die Expression von hCAT2b unter Einfluß der einzelnen Zytokine mit dem des TH1-Zytokincocktails, so zeigte sich bei der Gabe von 800 U/ml Interferon γ eine Abnahme der Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrolle. Für TNF α und IL-1 β war eine deutliche Zunahme zu verzeichnen, wobei diese für IL-1 β am stärksten ausfiel (Abbildung 3.5-5).

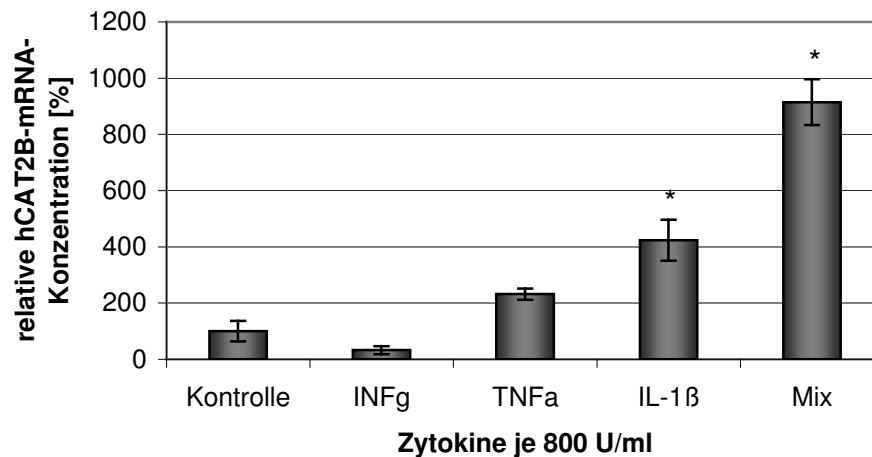


Abbildung 3.5-5 quantitative Bewertung der hCAT2b-Expression unter Einfluß einzelner Zytokine im Vergleich zum Zytokincocktail. (n=3, *= p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

3.5.2 Einfluß der TH1-Zytokine auf die L-Arginin-Aufnahme in HDMEC

Nachdem je 5 Schälchen HDMEC 24 h mit 800 U/ml eines Zytokincocktails (TNF α , IL-1 β und INF γ) und je 5 Schälchen mit reinem EGM-MV inkubiert wurden, konnte ein L-Arginin-uptake wie unter 2.2.16 beschrieben durchgeführt werden. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der intrazellulären L-Arginin-Konzentration der mit TH1-Zytokinen behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.5-6).

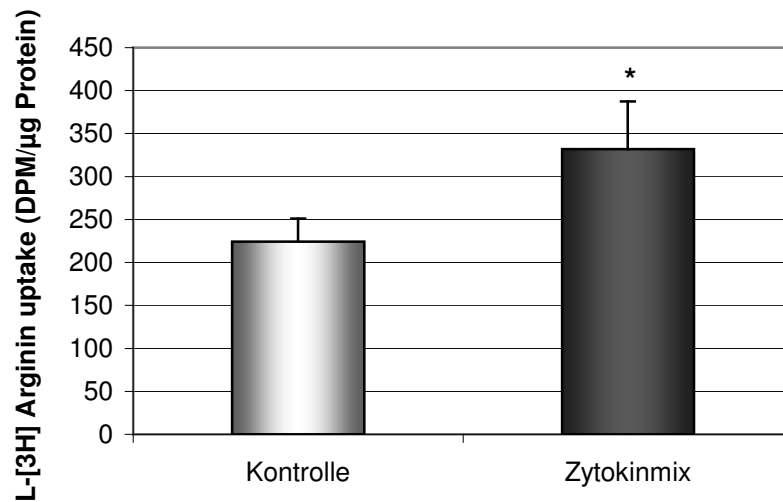


Abbildung 3.5-6 L-Arginin-uptake in HDMEC nach 24-stündiger Inkubation mit je 800 U/ml $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. $n=5$; $p\leq 0,05$, one way ANOVA.

3.5.3 Regulation des γ^+ -Systems durch TH1-Zytokine in NHEK

In nativen Keratinozyten zeigten die TH1-Zytokine einen eher negativen Einfluß auf die RNA-Expression des γ^+ -Systems. So zeigte sich nach 48 h für alle drei untersuchten γ^+ -Transportergene ein Abfall der RNA-Expression. Jedoch war auch hier nach 24 h ein deutlicher Anstieg der hCAT2b mRNA zu erkennen, der die Kontrolle um das 3fache übertreffen konnte.

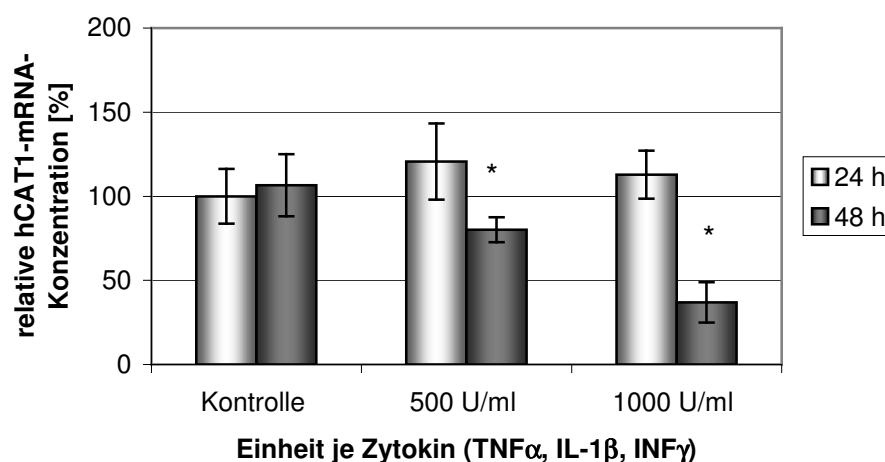


Abbildung 3.5-7 Quantitative Auswertung der hCAT1-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 1000 U/ml $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$. Die Werte wurden auf die Kontrolle 24 h bezogen. ($n=3$, $*= p<0,05$, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

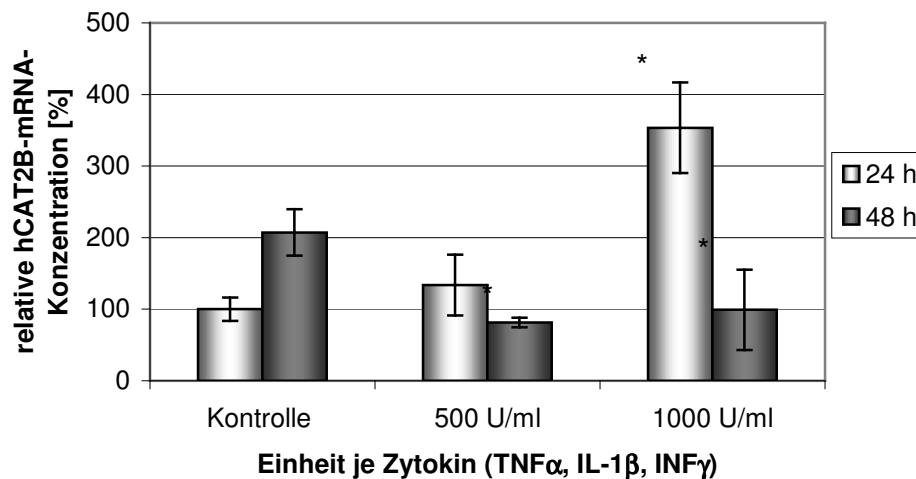


Abbildung 3.5-8 Quantitative Auswertung der hCAT2b-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 1000 U/ml TNF α , IL-1 β und INF γ . Die Werte wurden auf die Kontrolle 24 h bezogen. (n=3, * = p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

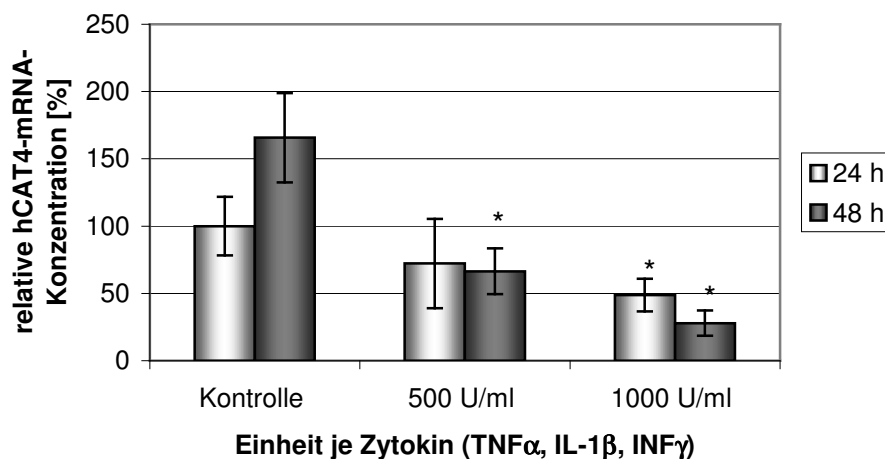


Abbildung 3.5-9 Quantitative Auswertung der hCAT4-mRNA-Expression nach Applikation von jeweils 500 U/ml bzw. 1000 U/ml TNF α , IL-1 β und INF γ . Die Werte wurden auf die Kontrolle 24 h bezogen. (n=3, * = p<0,05, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle).

3.6 Immunhistologischer Vergleich von hCAT1- und 2-Expression in Hautbiopsien von Psoriatikern und Hautgesunden

Immunhistochemisch gefärbte Hautbiopsien Hautgesunder und Psoriatiker sollten die Verteilung des hCAT1-(n=18 bzw. 32) und 2-(n=32 bzw. 17) Proteins innerhalb der einzelnen Hautschichten zeigen und Auskunft über eine mögliche Veränderung der Proteinexpression bei psoriatischer Erkrankung im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe geben. Die Präparate wurden mit der unter 2.2.17 beschriebenen Methode gefärbt und visuell am Mikroskop ausgewertet. Die Bewertung des Scores wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

- 1 keine Färbung (0 %)
- 2 schwache Färbung (1 %-25 %)
- 3 deutliche Färbung (26 %-50 %)
- 4 kräftige Färbung (51 %-75 %)
- 5 starke Färbung (76 %-100 %).

Dabei wurden je 10 Felder pro Proband für die einzelnen Epidermisschichten nach dem angegebenen Score bewertet, gemittelt und der Mittelwert als ein Ereignis betrachtet. Die einzelnen Ereignisse wurden schließlich in einer Kontingenztabelle erfaßt. Eine statistische Auswertung mit dem χ^2 -Test konnte nicht vorgenommen werden, da jeweils für mehr als 20 % der Fälle die Häufigkeit 0 auftrat. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden die Werte zusätzlich in einem Säulendiagramm dargestellt. Dazu wurden die Einzelereignisse einer Punktbewertung unterzogen: 1 Punkt für Score 1, 2 Punkte für Score 2 usw. Die Summe der Punkte für die jeweilige Hautschicht, Hautzustand und Protein wurde ins Verhältnis zur jeweiligen Präparatmenge n gesetzt und in einer Säule dargestellt.

Es zeigte sich, daß hCAT1 in Hautgesunden vor allem im mikrovaskulären Gefäßendothel des tieferen Unterhautgewebes und im Stratum granulosum exprimiert wird. Eine schwächere Färbung zeigte sich im Stratum basale und im oberen bzw. unteren Stratum spinosum. Bei psoriatischen Hautbiopsien wird hCAT1 hauptsächlich im mikrovaskulären Gefäßendothel des tieferen Unterhautgewebes exprimiert. Die Färbung des Antikörpers nimmt ab hier, mit nach oben kommender Hautschicht, stetig ab und zeigt seine geringste Anfärbung im Stratum granulosum. (Abbildung 3.6-2).

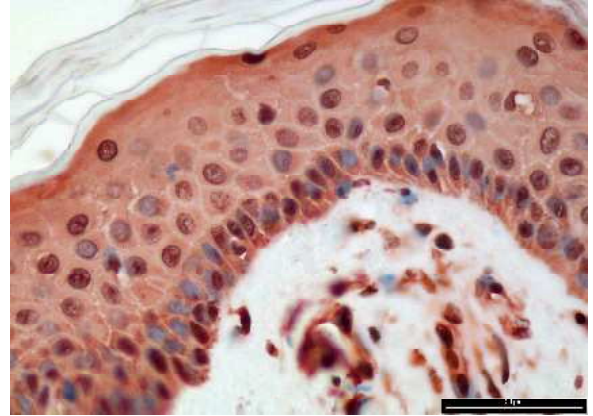
A**B**

Abbildung 3.6-1 Histologische Färbung mit hCAT1-Antikörper A) von psoriatischer und B) von gesunder Haut.

StG	Stratum granulosum
oStS	oberes Stratum spinosum
uStS	unteres Stratum spinosum
StB	Stratum basale
K	mikrovaskuläres Gefäßendothel im Korium

Tabelle 3-1 Abkürzungsverzeichnis der Epidermisschichten.

Psoriasis - hCAT1

Hautschicht Scorewert /SW	1	2	3	4	5	$\Sigma^*SW/(n_{ps}/n_{ges.})$
StG	7	20	6	0	0	36
oStS	0	30	3	0	0	38
uStS	0	21	12	0	0	43
StB	0	1	29	3	0	55
K	0	0	0	15	18	82
n= 33						

Gesund - hCAT1

Hautschicht Scorewert /SW	1	2	3	4	5	$\Sigma^*SW/(n_{ges.}/n_{ges.})$
StG	0	0	0	6	12	84
oStS	0	2	15	1	0	53
uStS	0	2	14	2	0	54
StB	0	1	9	7	1	62
K	0	0	0	5	13	85
n= 18						

Tabelle 3-2 Kontingenztabelle zur Bewertung der Proteinverteilung von hCAT1 in gesunder und psoriatischer Haut.

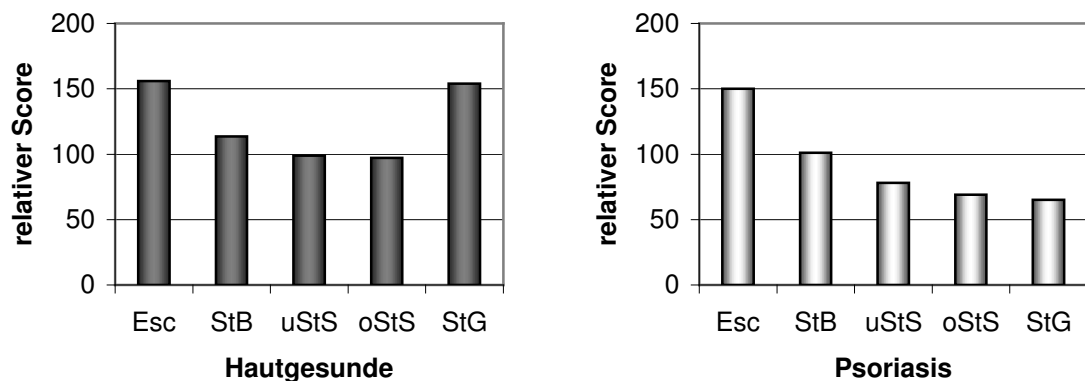
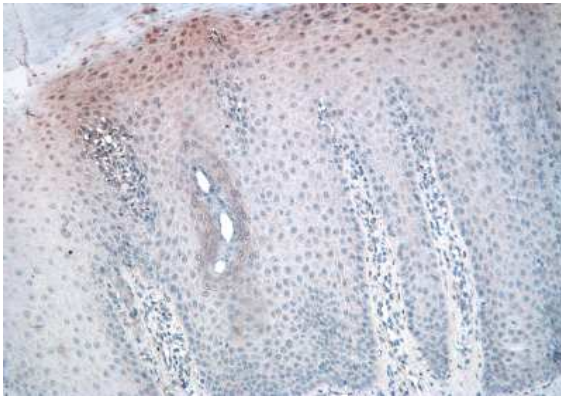


Abbildung 3.6-2 Immunhistologischen Befund hCAT1-gefärbter Hautschichten Hautgesunder im Vergleich zu Psoriatikern.

Die Auswertung der mit hCAT2-Antikörper gefärbten Präparate ergab eine insgesamt schwächere Färbung der psoriatischen Präparate im Vergleich zu den Kontroll-Biopsien. Die Verteilung des hCAT2-Proteins innerhalb der einzelnen Epidermisschichten ist in beiden Ereignisgruppen sehr homogen, so kommt es bei den Psoriatikern zu einer Schwankung von etwa 26 % und bei den Gesunden sogar nur zu etwa 12 %.

A



B

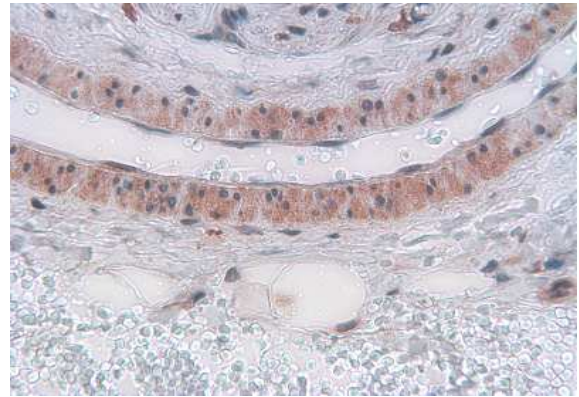


Abbildung 3.6-3 Histologische Färbung mit hCAT2-Antikörper von psoriatischer Haut A) in der Epidermis B) im Längsschnitt einer Venole.

Psoriasis – hCAT2

Hautschicht Scorewert /SW	1	2	3	4	5	$\Sigma^*SW/(n_{ps.}/n_{ps.})$
Esc	0	0	3	7	7	72
StB	3	6	5	2	1	43
uStS	2	11	4	0	0	36
oStS	2	11	4	0	0	36
StG	0	5	9	3	0	49
n= 17						

Gesund – hCAT2

Hautschicht Scorewert(SW)	1	2	3	4	5	$\Sigma^*SW/(n_{ges.}/n_{ps.})$
Esc	0	0	0	4	28	83
StB	0	0	1	24	7	71
uStS	0	0	0	26	6	71
oStS	0	1	1	24	6	70
StG	0	0	0	9	23	80
n= 32						

Tabelle 3-3 Kontingenztabelle zur Bewertung der Proteinverteilung von hCAT2 in gesunder und psoriatischer Haut.

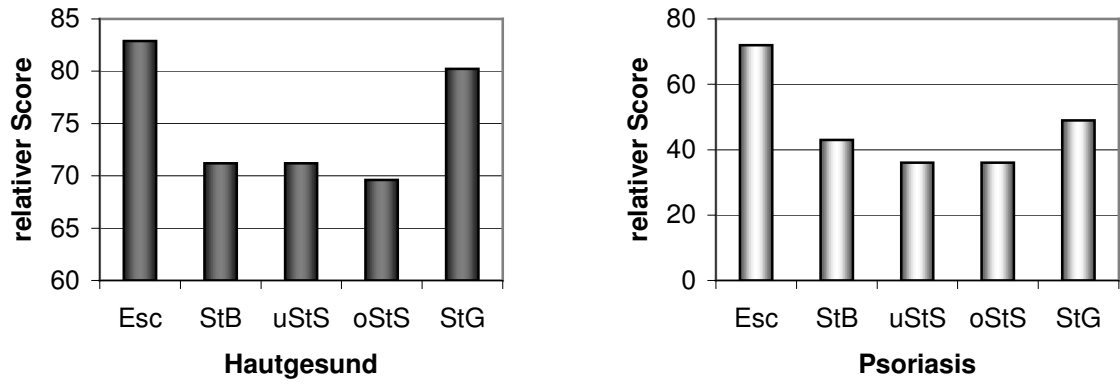


Abbildung 3.6-4 Darstellung der Punktwerte für die mit hCAT2-Antikörper gefärbten Präparate.

4 Diskussion

4.1 Wird der γ^+ -Transporter in Hautzellen exprimiert und gibt es Unterschiede in der Expression der einzelnen Komponenten?

Zur Untersuchung des γ^+ -Systems mußte zunächst der Nachweis in den als Modellsystem verwendeten Hautzelltypen und schließlich an Hautbiopsien erfolgen. Es ist bekannt, daß das γ^+ -System im Menschen durch die CAT-Proteine präsentiert werden, die wiederum durch mindestens vier Gene (hCAT1-4) codiert werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis des γ^+ -Transporters auf mRNA-Ebene, über eine RT-PCR für die von hCAT1-, 2-, 2A-, 2B- und 4-Transkripte in HaCaT, NHEK und HDMEC, während hCAT3 in diesen Zellen nicht exprimiert wurde. Über eine Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate und einem Sequenzabgleich in der Datenbank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) ließen sich die erhaltenen Produkte eindeutig den gewünschten Genen zuordnen. Da die Zellen, aus denen die RNA für den Gennachweis gewonnen wurde, keinen bekannten Streßfaktoren ausgesetzt wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die Gene in diesen Zellen konstitutiv transkribiert werden. Dies stellt zumindest für hCAT2A eine Besonderheit dar. Bislang konnte eine konstitutive Expression für diesen Transportersubtyp nur in Hepatozyten und Muskelzellen nachgewiesen werden. In vielen anderen Zelltypen wurde erst eine de novo Expression nach inflammatorischen Stimuli beobachtet (Kawahara et al., 2001; Closs et al., 1997). Diese konstitutive Expression von hCAT2 in NHEK, HaCaT und HDMEC konnte kürzlich auch von Schnorr et al. (2003) bestätigt werden. Eine nähere Betrachtung der Expressionsstärke der einzelnen Transkripte über eine Real-Time-PCR zeigte, daß hCAT1 in HaCaT und nativen Keratinozyten sowie mikrovaskulären Endothelzellen 10-140 mal stärker exprimiert wird als die vier anderen Transkripte. Das läßt darauf schließen, daß hCAT1 der Hauptsubtyp des γ^+ -Systems in diesen Zellen ist. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen stützen diese Vermutung. So wird hCAT1, außer in der Leber, ubiquitär exprimiert, hCAT2, 3 und 4 hingegen nur in einigen Geweben (Devés and Boyd, 1998), wie Leber, Gehirn, Thymus usw. Knockout-Maus-Versuche zeigten, daß homozygote CAT1-knockout Mäuse am ersten Tag der Geburt sterben, 25% kleiner sind als der Wildtyp und an schwerer Anämie leiden, während heterozygote Mäuse phänotypisch keine Abnormalitäten

aufweisen (Perkins et al., 1997). Homozygote CAT2-Knockout-Mausmutanten sind hingegen vital und fertil (Nicholson et al., 2001). Die nahezu normale Entwicklung der homozygoten CAT1-Knockout-Mausmutanten bis zur Geburt wird nur durch die funktionelle Kompensation durch CAT3, welches zu diesem Zeitpunkt noch ubiquitär exprimiert wird, in Mausembryonen und -föten gewährleistet. Nach der Geburt wird dieses in Rodentia jedoch ausschließlich im Gehirn exprimiert (Nicholson et al., 1998), so daß es kompensatorisch nicht mehr fungieren kann. Dieser Befund ist allerdings mit dem beim Menschen nicht zu vergleichen, da hCAT3 ein anderes Expressionsmuster als mCAT3 aufweist. So wird hCAT3 hauptsächlich in peripheren Gewebe, wie Thymus, Testes, Ovarien, Milchdrüsen usw. exprimiert und nur gering in einigen Hirnregionen (Vekony et al., 2001).

Eine weitere Besonderheit der Expressionsstärken zeigt sich im Vergleich von hCAT2 und 4 in den untersuchten nativen Zellen. So wird hCAT2B in HDMEC 10 mal stärker als hCAT4 exprimiert, in NHEK ist dieser Befund genau invers. Dieses Ergebnis läßt eine besondere Funktion dieser Subtypen beim L-Arginin-Transport vermuten. Es ist bekannt, daß sowohl mikrovaskuläre Endothelzellen als auch hCAT2b in inflammatorische Prozesse maßgeblich involviert sind, wobei als Verbindungsfaktor hier Stickstoffmonoxid fungiert. So erfolgt die Initiation und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen unter der Beteiligung des Mikrogefäßsystems (Swerlick et al., 1993), wobei NO als autokriner und parakriner Mediator bei der intra- und interzellulären Kommunikation zwischen verschiedenen Zellsystemen der Haut agiert (Bruch-Gerharz et al., 1998). Versuche mit zytokinaktivierten Makrophagen aus CAT2^{-/-}-Mäusen zeigten eine 92%ige Reduktion in der NO-Produktion und eine 95%ige Reduktion der L-Arginin-Aufnahme. Da dieser Befund weder auf die iNOS-Proteinexpression noch auf die iNOS-Aktivität zurückzuführen war, wurde geschlussfolgert, daß zur Aufrechterhaltung der NO-Produktion der Arginintransport über CAT2 erforderlich ist. Diese Ergebnisse und die Erkenntnis, daß hCAT2B als zweitstärkster Subtyp in HDMEC exprimiert wird, lassen den Schluß zu, daß hCAT2B in inflammatorische Prozesse involviert sein kann. In NHEK hingegen scheint es eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Inwieweit hCAT4 für die L-Arginin-Aufnahme in Keratinozyten essentiell ist, kann nur spekuliert werden, da es für hCAT4 bislang keinerlei funktionelle Untersuchungen gibt. Der Vergleich der Expression der beiden Spleißvarianten von hCAT2 zeigt, daß hCAT2B scheinbar bevorzugt gebildet wird. So spielt hCAT2A in HaCaT und nativen Keratinozyten

wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle. In HDMEC wird hCAT2A zumindest noch halb so stark wie hCAT2B exprimiert und übersteigt damit die Expression von hCAT2B der Keratinozyten mindestens um das Doppelte. Auch über CAT2A gibt es nur wenig Informationen. Man geht davon aus, daß der niedrigaffine hCAT2A-Transporter hauptsächlich in der Leber exprimiert wird (Closs et al., 1993) und somit in anderen Zellen funktionell keine bzw. eine untergeordnete Rolle spielt. In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals nachgewiesen werden, daß auch hCAT2A extrahepatisch und zwar in Hautzellen (HaCaT, NHEK und HDMEC), konstitutiv exprimiert wird.

Auf Proteinebene war mit den zur Verfügung stehenden Methoden (Western Blot, Immunhistochemie) leider keine exakte Quantifizierung der Synthese des γ^+ -Systems möglich. So konnte hCAT2 im Western Blot nicht nachgewiesen werden, da die Expression dieses Proteins zu gering für die Sensitivität des Tests war. Die Ergebnisse der RNA-Untersuchungen lassen sich jedoch dahingehend interpretieren, daß hier hCAT1 ebenfalls am stärksten synthetisiert wird und somit auch auf Proteinebene als Hauptsubtyp fungiert. Über die immunhistochemische Anfärbung gesunder Haut mit spezifischen Antikörpern konnte zusätzlich eine Aussage über die Verteilung der einzelnen Transporterproteine getroffen werden. Es zeigte sich, daß hCAT1 vor allem im Stratum granulosum, Stratum basale und im perivaskulären Bereich der Blutgefäße gebildet wird (Abbildung 3.1-5). Im Stratum granulosum sind die Keratinozyten jedoch durch DNA-Fragmentierung und Endonucleaseaktivität gekennzeichnet (McCall et al., 1991). In dieser Zellschicht wird die Differenzierung vom lebenden Keratinozyten zum toten Korneozyten abgeschlossen. Diese Tatsache hätte eher die Vermutung zugelassen, daß in dieser Schicht der Transporter kaum bzw. nicht mehr als in den anderen Oberhautschichten exprimiert wird. Da das Stratum granulosum jedoch eine sehr kompakte Epidermisschicht ist und somit die Zellen sehr dicht beieinander liegen, könnte es sich hier um eine artifizielle Quantifizierung handeln. Das heißt durch die Anhäufung vieler Zellen auf kleinem Raum kann der Eindruck entstehen das in dieser Schicht der Transporter stärker exprimiert wird. Dagegen erscheint nicht verwunderlich, daß der Transporter in den beiden anderen Bereichen vermehrt synthetisiert wird. So ist die Verfügbarkeit von L-Arginin in diesen Zellschichten essentiell. Zum einen ist es erforderlich für die Neubildung der Keratinozyten im Stratum basale als Precursor für die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin. Diese sind essentiell für die Zellproliferation,

indem sie DNA binden und die Genexpression durch Änderungen in der Chromatinstruktur beeinflussen (Marton et al., 1987). Zum anderen wird L-Arginin durch die NOS zu L-Citrullin und NO metabolisiert, wobei das radikalische NO durch die Initiation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei mikrovaskulären Endothelzellen (McAllister et al.; 1997) wesentlich zu physiologischen und pathophysiologischen Entzündungsprozessen beiträgt. hCAT2 und 4 werden, übereinstimmend mit den RNA-Ergebnissen, im Gewebeschnitt wesentlich schwächer angefärbt als hCAT1. Beide Proteine zeigen eine sehr gleichmäßige Verteilung in der Epidermis, jedoch ist hier eine genaue Quantifizierung durch die geringe Expressionsstärke schwer vorzunehmen.

Fazit : hCAT1 ist der Hauptsubtyp des γ^+ -Systems in HDMEC und NHEK.

Die differente Expression der Subtypen hCAT2b und 4 in den genannten Zelltypen spricht für eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung.

4.2 Haben kationische Aminosäuren einen Einfluß auf die Expression des γ^+ -Transporters?

Der Transport der kationischen Aminosäure L-Arginin über das γ^+ -System kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. So wird der Transport durch einen Überschuß an den, um den Transport konkurrierenden kationischen Aminosäuren (L-

	hCAT1	hCAT2 bzw. 2b	hCAT4
RNA	L-Arg	+	-
	L-Orn	±	++
Protein	L-Arg	+	MD
	L-Orn	-	MD

Tabelle 4-1 Zusammenfassung der Ergebnisse von 3.4. ++ stark erhöhte Expression; + erhöhte Expression; ± keinen Einfluß; - geringere Expression; MD missing data.

Ornithin und L-Lysin) sowie durch verschiedene L-Argininanaloga (z.B. L-Monomethyl-L-Arginin, L-N-(iminoethyl)ornithin, L-Canavanin und N-Nitro-L-Arginin) gehemmt (DeGeorge et al., 1997). Die Aktivität des γ^+ -Transporters wird wahrscheinlich spannungsabhängig über die Hyperpolarisation der Zellmembran gesteuert (Segel et al., 1995; Sobrevia et al., 1996). Die Öffnungen kalziumabhängiger Kaliumkanäle führt zu einer Hyperpolarisation und zum verstärkten Influx von L-Arginin über das γ^+ -System. Die Aktivität kann also grundsätzlich durch die Konzentration der, um den Transporter konkurrierenden Aminosäuren beeinflusst werden. Können diese Aminosäuren jedoch auch die Expression ihres eigenen Transporters induzieren? Bekannt ist, daß in Säugerzellen an die Abnahme der Aminosäureverfügbarkeit eine Abnahme der Proteinsynthese (Pain et al., 1994), der mRNA-Stabilität und der Gentranskriptmenge gekoppelt ist (Marten et al., 1994). Die Inhibierung der Proteinsynthese erfolgt durch die Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF-2 (Scorsone et al., 1987). Hefezellen können diesen Effekt bei totaler bzw. teilweiser Entleerung kompensieren, indem sie die Transkription von Genen, die in die Aminosäurebiosynthese involviert sind, aktivieren (Laine et al., 1994). Man vermutet, daß Säugetiere, ähnlich wie Hefen, auch Kontrollmechanismen besitzen, um auf dieses Phänomen kompensatorisch zu reagieren (Laine et al., 1994). Es zeigte sich, daß es bei einem Aminosäurenentzug zur Stabilitätserhöhung von Aminosäuren-mRNA kommt (Gong et al., 1991). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß es durch die Aminosäurelimitierung zu einer Anhäufung von CAT1-mRNA in kultivierten C6 Gliom- und Nierenzellen kommt (Hyatt et al., 1997). Die Akkumulation der mRNA wurde schließlich auf die Erhöhung der mRNA-Halbwertszeit zurückgeführt, wodurch es für das System möglich wurde, vermehrt CAT1-Protein und somit auch vermehrt den kationischen Transporter zu bilden (Aulak et al., 1999).

Somit ist auch denkbar, daß ein Einfluß auf die Synthese des Transporters durch Zugabe kationischer Aminosäuren erfolgen kann. Es zeigte sich, daß in nativen Keratinozyten bei der Zugabe von L-Arginin vor allem eine Steigerung von hCAT1 und hCAT2 und zu einer Abnahme von hCAT4 beobachtet werden kann. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse bei der L-Ornithin-Substitution, welches auf die hCAT1-Expression keinen bzw. einen negativen Einfluß hat und auf die Synthese der beiden Subtypen hCAT2b und 4 einen stark positiven Einfluß zeigt. Es konnte demonstriert werden, daß sowohl L-Ornithin als auch L-Arginin einen Einfluß auf alle

drei untersuchten Transportergene bzw. -proteine besitzen. Nach Gabe eines absoluten Überangebots von 15 mM L-Arginin konnte nach 72 h eine Erhöhung der hCAT1-Expression sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene um etwa 70 % erreicht werden. Für hCAT2b zeigte sich schon nach 24 h durch den annähernd physiologischen Wert von 2 mM L-Arginin ein Anstieg um 50 %. Auch die Arbeitsgruppe um deNigris konnte zeigen, daß es durch die Gabe von L-Arginin möglich ist, die Genexpression zu steigern. Es zeigte sich eine Erhöhung der eNOS-Expression sowohl in vitro als auch in vivo (de Nigris et al., 2003). Da die Proteine hCAT1 und 2 mit den Isoenzymen der NOS assoziiert sind, hCAT1 mit eNOS (McDonald et al., 1997) und hCAT2b mit iNOS (Manner et al., 2003), wäre eine Erhöhung der hCAT-Expression durch L-Arginin physiologisch sinnvoll. Durch den vermehrten Einstrom von L-Arginin und die direkte Beladung der NOS wäre auch eine Erhöhung der NO-Produktion möglich. Man sollte zunächst annehmen, daß eine Steigerung der NO-Produktion durch extrazelluläres L-Arginin theoretisch nicht möglich ist, da ein K_m -Wert von L-Arginin als Substrat für die NOS von 2-10 μM ermittelt wurde (Arnal et al., 1995; Bogle et al., 1996; Kurz and Harrison, 1997) und die intrazelluläre L-Argininkonzentration in einem Bereich liegt, der 30-800 mal über diesem K_m -Wert liegt (McDonald et al., 1997). Dennoch wurde in verschiedenen in vivo Studien eine Zunahme der NO-Freisetzung unter bestimmten physiologischen Bedingungen trotz des gesättigten intrazellulären Zustandes nachgewiesen. Dieses Phänomen wird als *arginine paradox* bezeichnet (Closs et al., 2000; Xiao et al., 2001). Eine Erklärung sollte die direkte Beladung der eNOS mit NO über hCAT1 geben. McDonald et al. (1997) konnten zeigen, daß beide Proteine über einen Calveolarkomplex verbunden sind, der diesen Vorgang ermöglicht. Da NO auch als freies Radikal auftritt, besitzt es ein hohes Reaktionspotential und reagiert mit verschiedenen Enzymen (Hibbs et al., 1988). Es kann schließlich auch die DNA- und Proteinsynthese hemmen (Nathan et al., 1992). Die vermutete Steigerung der NO-Synthese könnte somit die zeit- und konzentrationsabhängige Verminderung der hCAT2b und 4-Expression erklären. Warum hCAT1 davon unbeeinflusst bleibt, kann nur spekulativ betrachtet werden. Denkbar wäre, daß auch hier eine mRNA-Stabilisierung eintritt, um die Grundversorgung der Zelle mit L-Arginin auch in Streßsituationen aufrechtzuerhalten. Da L-Arginin nicht nur als Precursor für NO fungiert, sondern auch für viele andere Mediatoren, Regulatoren, Modulatoren usw., ist es essentiell für das Überleben der Zelle bzw. auch für einen programmierten

Zelltod. hCAT1 wäre als Hauptkomponente somit für die Basisversorgung der Zelle mit L-Arginin in jeder Situation mitverantwortlich, wohingegen hCAT2 und 4 speziellere Aufgaben wahrnehmen könnten. Auch daß hCAT1 in allen untersuchten Zelltypen 10 - 140fach stärker exprimiert wird als hCAT2 und 4 und daß es zu einer unterschiedlichen Bevorzugung der Nebenkomponten hCAT2b und 4 in HDMEC und NHEK kommt (Recker et al., 2003), spricht für diese Vermutung.

Die Untersuchungen zur Beeinflussung des Transporters durch L-Ornithin zeigen, daß es nach 48 h durch die L-Ornithingabe zu einer Abnahme der hCAT1-Proteinsynthese kommt, die hCAT2b und 4-Expression wird dagegen auf mRNA-Ebene durch diese Aminosäure stark gefördert. Auch hier zeigt sich, daß die einzelnen γ^+ -Transporterproteine/gene durch L-Ornithin unterschiedlich beeinflussbar sind. Warum diese Gene, auf zwei kationische Aminosäuren, mit ähnlicher chemischer Struktur und vergleichbaren physikochemischen Eigenschaften, invers reagieren bleibt unklar. Das Ergebnis spricht jedoch dafür, daß hCAT1 als L-Arginin-Basistransportkomponente und hCAT2 sowie 4 als „Spezialtransportsubtyp“ fungieren. Auch Closs et al. (1997) vermuten eine spezifische Rolle für mCAT-2B in L-Arginin-abhängigen Prozessen, wie die NO- oder Polyaminsynthese. Wenn hCAT2B wirklich für die Bereitstellung der Precursor verantwortlich ist, ließe sich damit der hohe Anstieg der mRNA-Syntheseleistung von hCAT2b erklären. Für hCAT4 wäre eine ähnliche Funktion denkbar. Die Abnahme der Proteinsynthese von hCAT1 und 4 nach 48 h durch L-Ornithin reguliert sich bei beiden Proteinen nach weiteren 24 h wieder auf Basislevel bzw. auf gesteigerte Produktion um 200%. Die Abnahme der hCAT-Produktion zeigt sich jedoch nur auf Proteinebene. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Regulierung posttranskriptional erfolgt. Scheinbar muß sich das System erst auf die hyperphysiologische L-Ornithingabe adaptieren. Es ist bekannt, daß es durch L-Ornithin zum einen zu einer kompetitiven Hemmung des L-Arginintransports in die Zelle (Inoue et al., 1993) und zum anderen zu einer Inhibierung der Arginase I (Reczkowski et al., 1994) kommt. Die Zelle reagiert also auf das Überangebot an L-Ornithin mit einem Stop von verschiedenen Funktionen, die zur Neubildung von L-Ornithin führen. Somit kann vermutet werden, daß auch eine Blockierung der Proteinsynthese des Transporters von L-Ornithin und des Precursors von L-Arginin bewirkt wird. Da L-Ornithin auch der Precursor für die Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin ist und diese vor allem Differenzierungs- und Proliferationsprozesse unter L-Ornithinverbrauch beeinflussen,

ist es denkbar, daß sich das System nach einiger Zeit erholt und die Proteinsynthese wieder auf den Ausgangswert reguliert. Die Bedeutung von L-Lysin im Hautorgan ist bisher nicht untersucht worden. Da sich aber in anderen Zelltypen keine Hinweise auf eine für die in dieser Arbeit relevante Schlüsselfunktion ergeben haben, wurden hier die L-Lysin-abhängigen Effekte nicht untersucht.

Fazit: Sowohl L-Arginin als auch L-Ornithin beeinflussen die Expression des γ^+ -Systems auf mRNA- und Proteinebene, und regulieren somit über feedback-Mechanismen ihren eigenen Transport.

4.3 Haben TH1-Zytokine Einfluß auf den γ^+ -Transporter?

Die kationische Aminosäure L-Arginin spielt als gemeinsames physiologisches Substrat der NOS und der Arginase (Mori and Gotoh, 2000) eine zentrale Schlüsselrolle in verschiedenen epidermalen Funktionen der menschlichen Haut. Als semiessentielle Aminosäure ist der Transport von L-Arginin in die Zelle für die meisten Zelltypen absolut erforderlich. Dadurch kommt es zu einer gewissen Abhängigkeit der L-Arginin metabolisierenden Enzyme vom L-Arginin-Influx vermittelnden γ^+ -Transporter (Nicholson et al., 2001). In verschiedenen Geweben wurde gezeigt, daß die Expressions- und Aktivitäts-Beeinflussung des γ^+ -Transporters einen regulatorischen Eingriff in die NO- und Harnstoff-Synthese ermöglicht (Irie et al., 1997). Vor allem die Regulation der NOS-Aktivität ist wichtig für die Hauthomeostase. So wird durch deren Produkt NO die Proliferation, Differenzierung, Wundheilung und die Genexpression in der menschlichen Haut beeinflusst (Bruch-Gerharz et al., 1998). Es zeigte sich, daß es durch TH1-Zytokine in Makrophagen zu einer gesteigerten NO-Produktion kommt und daß für die NO-Produktion vor allem die hCAT2 vermittelte L-Arginin-Aufnahme essentiell ist (Bruch-Gerharz et al., 1998). Spätere Versuche mit CAT2^{-/-}-Knockout-Mausmutanten untermauerten diese These. So zeigten zytokinaktivierte Makrophagen der Mutanten eine 92%ige Abnahme der NO-Produktion und eine 95%ige Reduktion der L-Arginin-Aufnahme. Da sowohl die iNOS-Proteinexpression als auch die iNOS-Aktivität uneingeschränkt waren, konnte man die Inhibierung der NO-Produktion auf den CAT2-Verlust zurückführen (Nicholson et al., 2001). Die Manipulation der CAT2-

Transportfunktion wird heute sogar als mögliche therapeutische Modulation der iNOS-Aktivität diskutiert (Manner et al., 2003), da beide Proteine scheinbar in direktem Zusammenhang stehen (MacLeod et al., 1996). Um diese Befunde im Hinblick auf die epidermale Fehlfunktion der Psoriasis zu untersuchen, wurden zwei Zelltypen ausgewählt, die maßgeblich in diese Prozesse involviert sind: die Keratinozyten als Symptomträger der Hyperkeratose und Zytokin-Reaktor und die mikrovaskulären Endothelzellen als Expressionssort verschiedener Zytokine (IL-1, TNF α u.a.) (Geiser et al., 1999)., Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF). Beide Zelltypen wurden mit einem Cocktail aus den TH1-Zytokinen, TNF α , IL-1 β und INF γ inkubiert. Dabei zeigten bereits die Toxizitätsuntersuchungen, daß die mikrovaskulären Endothelzellen unempfindlicher auf hohe Konzentrationen und lange Behandlungszeiten reagieren als native Keratinozyten. In weiteren in vitro Untersuchungen, in denen auf Mediatorenebene eine Entzündung durch den Zytokincocktail simuliert wurde zeigte sich, daß auch hier insbesondere die mikrovaskulären Endothelzellen mit einer erhöhten Expression des γ^+ -Transporters reagieren. Es kommt nicht nur zu der vermuteten Hochregulation der hCAT2-mRNA, sondern zusätzlich zu einer vermehrten hCAT1-mRNA-Expression (Abbildung 3.5-1). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Zytokin-abhängige Steigerung der hCAT1-mRNA-Synthese in HDMEC nachgewiesen werden, obwohl diese Zellen schon im Ruhezustand diese Transporterkomponente in hohem Maße exprimieren. Ähnliche Ergebnisse konnte auch die Gruppe von Schnorr et al. (2003) mit HaCaT-Keratinozyten erzielen. Für hCAT4 zeigte sich prozentual die gleiche Steigerung wie für hCAT1, allerdings auch nur in HDMEC. In nativen Keratinozyten scheinen die proinflammatorischen Zytokine, zumindest im nicht toxischen Bereich, keinen Einfluß auf die hCAT1 bzw. 4 mRNA-Expression zu haben. Dagegen kommt es in NHEK zu einer 3,5fachen Steigerung der hCAT2B mRNA, die auch durch Schnorr et al. (2003) bestätigt werden konnte. Schnorr et al. (2003) untersuchten auch die hCAT2 mRNA-Expression in HDMEC und konnten dort keinen Unterschied im Vergleich zu NHEK feststellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch eine nochmals um den Faktor 10 gesteigerte Expression von hCAT2B im Vergleich zu nativen Keratinozyten. Für hCAT2A ließ sich immerhin noch eine dreifache Steigerung demonstrieren (Recker et al., 2003). Die Diskrepanz der Ergebnisse in beiden Arbeitsgruppen ist durch die verschiedenen Methoden zur Quantifizierung der erhaltenen PCR-Produkte zu erklären. Schnorr et al. (2003) werteten die Produkte

densitometrisch nach Durchführung einer semiquantitativen PCR aus. Allerdings können damit nur geschätzte Werte ermittelt werden. Jedes PCR-Produkt ist während seiner Amplifikation einer Logarithmusfunktion unterworfen, die je nach gegebenen Bedingungen variiert. Zur Quantifizierung der Produkte muß man diese während der PCR in einer log-Phase erfassen. Die semiquantitative PCR limitiert sich durch eine vorgegebene Zyklenzahl und somit kann der logarithmische Verlauf der PCR nicht erfasst werden. Die in dieser Arbeit angewandte Real-Time-PCR löst dieses Problem, indem alle 7 s während der Annealing-Phase eine Messung der gewonnenen DNA-Menge vorgenommen wird. Dadurch ist eine genaue Aufzeichnung des Kurvenverlaufs der durchgeführten PCR in Echtzeit und eine relative und absolute Quantifizierung der Amplifikate möglich.

Obwohl NHEK als auch HDMEC in der Haut lokalisiert sind, erfüllen sie unterschiedliche Funktionen, die auch Unterschiede im Expressionsmuster bestimmter Gene und Unterschiede in der Art der Metabolisierung verschiedener Substanzen (wie L-Arginin) erwarten lassen. Native Keratinozyten bauen zu 90 % die Epidermis auf, die die Barriere zwischen Organismus und Umwelt darstellt. Um diese Barriere aufrechtzuerhalten, ist eine ständige Akquisition von L-Arginin erforderlich, welches durch die Arginase zu Harnstoff metabolisiert wird. Diese Aufgabe ist stetig zu erfüllen und kann durch hCAT1 als Hauptkomponente des γ^+ -Transporters in NHEK (Recker et al., 2003) abgedeckt werden. Bekanntermaßen kann L-Arginin in Keratinozyten auch zu NO umgewandelt werden, welches in geringen Mengen proliferationssteigernd auf diese Zellen wirkt (Krischel et al., 1998). Da Keratinozyten scheinbar nicht in der Lage sind, L-Arginin intern zu recyceln (Crouse and Rothberg, 1961; Ratner, 1973), ist eine ständige Aufnahme der kationischen Aminosäure in die Zelle essentiell, um die Barrierefunktion und die Proliferation aufrechtzuerhalten. Dies wird durch eine hohe Basisexpression des L-Arginin-transporters gewährleistet. Anders ist die Situation bei Endothelzellen, welche L-Arginin aus L-Citrullin zurückgewinnen können (Hecker et al., 1990). Diese Zellen kleiden die Gefäße aus, durch die der Organismus mit Wärme, Hormonen u.v.a. wichtigen Faktoren und Substanzen versorgt wird. Unstimuliert ist für die Erfüllung ihrer Aufgaben weder Harnstoff noch NO in großen Mengen nötig. Der dafür erforderliche Precursor kann ausreichend über das vorhandene γ^+ -System gewonnen werden. So zeigten Expressionsstudien an unstimulierten, menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen eine geringe Basisexpression der eNOS, eine

geringe NO-Produktion und keinerlei Hinweise auf eine Colokalisation der eNOS mit Caveolin-1 (Dye et al., 2003) und somit keine direkte Verbindung zwischen eNOS und hCAT1. Eine Steigerung der NO-Produktion in Endothelzellen ist jedoch durch das proinflammatorische LPS möglich (Closs et al., 1999), was sich durch eine gesteigerte L-Arginin-Aufnahme erklären würde. In der vorliegenden Arbeit konnte die Steigerung der Transportleistung durch proinflammatorische Zytokine demonstriert werden: Zum einen durch die Expressionsstudie von hCAT2A und B, welche durch die TH1-Zytokine um das 10 bzw. 3fache in ihrer mRNA-Synthese stiegen, und zum anderen durch die Uptake-Untersuchungen, welche einen signifikanten Anstieg der L-Arginin-Aufnahme in die Zelle zeigen. All diese Ergebnisse sprechen für eine veränderte Genexpression in mikrovaskulären Endothelzellen, ausgelöst durch proinflammatorische Zytokine. Die Genexpression von hCAT2 wird scheinbar über mindestens zwei Transkriptionsfaktoren reguliert. So kommt es zwar durch TNF α und IL-1 β , einzeln verabreicht, zu einem Anstieg der hCAT2b-mRNA-Expression, jedoch nicht durch INF γ (Abbildung 3.5-5). Der Effekt der einzelnen Zytokine ist auch nicht Additiv. So ergibt die Summe der Einzelereignisse einen geringeren Anstieg der Expressionsleistung als der Superadditive Mix der Zytokine. Es ist bekannt, daß TNF α und IL-1 β jeweils einzeln über eine Signalkaskade NF-KappaB aktivieren können (Neish et al., 1992). Als man die Promotorregion des iNOS Gens der Maus (Lowenstein et al., 1993), des Menschen (Zhang et al., 1996) und der Ratte (Eberhardt et al., 1996) charakterisierte, konnte man mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch für NF-KappaB, nachweisen. In Ratten- und Mausmakrophagen reichte NF-KappaB allein nicht aus, war aber essentiell für die Induktion von iNOS (Sherman et al., 1993; Xie et al., 1994; Ding et al., 1995; Kim et al., 1995; Xie et al., 1997). Der direkte Zusammenhang zu CAT2B gelang, als man eine simultane Induktion von iNOS und eine Hochregulation von CAT2b in Ratten-Alveolarmakrophagen erreichte (Hammermann et al., 2000). Diese Gruppe konnte außerdem zwei NF-KappaB Bindungsstellen in der teilweise aufgeklärten CAT2-Promotorsequenz der Maus identifizieren (Hammermann et al., 2000; Finley et al., 1995; Quandt et al., 1995), so daß eine Transkriptionsregulation von hCAT2A und B in HDMEC zumindest unter Beteiligung von NF-KappaB sehr wahrscheinlich ist. In den Signaltransduktionweg von INF γ ist jedoch IRF-1 (Shuai et al., 1992; Silvennoinen et al., 1993) und nicht NF-KappaB involviert. Scheinbar müssen beide Transkriptions-

faktoren in eine synergistische Interaktion treten, da sie in der Summe mehr erreichen als allein. Eine solche Kooperation konnte z.B. für die iNOS Gentranskription gezeigt werden (Saura et al., 1999).

Fazit: Es kommt zu einer synergistisch transkriptionellen Regulation von hCAT1 und 2 durch die TH1-Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF}\gamma$ vor allem in mikrovaskulären Endothelzellen. Dies spricht für ein unterschiedliches Expressionsmuster des y^+ -Transporters in nativen Keratinozyten und mikrovaskulären Endothelzellen.

4.4 Spielt der y^+ -Transporter eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis?

Kürzlich konnten verschiedene Zusammenhänge gefunden werden, die für eine Involvierung des L-Arginintransporters (y^+ -Transporter) in die abnormale Proliferation der Keratinozyten, welche entscheidend für die Pathogenese der Psoriasis zu sein scheint, sprechen. So werden in psoriatischen Hautläsionen die beiden L-Arginin metabolisierenden Enzyme Arginase 1 und iNOS sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene überexprimiert. Es zeigte sich, daß Arginase 1 durch TH2- und iNOS durch TH1- Zytokine hochreguliert werden (Bruch-Gerharz et al., 2003). Da beide Enzyme auf ihr gemeinsames Substrat L-Arginin angewiesen sind, erscheint ein Zusammenhang zu dem L-Arginin-vermittelnden Transporter y^+ sehr wahrscheinlich. Immunhistochemische Färbungen von Hautbiopsien Hautgesunder und Psoriatischer sollten darüber einen Einblick vermitteln. Aufgrund der Inhomogenität der histologischen Phänomene konnte nur ein Vergleich innerhalb der jeweiligen Diagnosegruppe erfolgen und somit nur eine Aussage zur Verteilung der Transportersubtypen in der jeweiligen Gruppe getroffen werden. Die Ergebnisse (Abbildung 3.6-2) zeigen in der hCAT1- und 2 Färbung vor allem Unterschiede zwischen mikrovaskulärem Gefäßendothel und Keratinozyten des Stratum granulosum, während in Biopsien Hautgesunder hCAT1 in beiden Hautschichten gleich stark exprimiert wird. Dieser Unterschied im Expressionsmuster zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und nativen Keratinozyten findet sich auch in vitro (Recker et al., 2003). Dort zeigen Endothelzellen auf die proinflammatorischen TH1-Zytokine eine wesentlich stärkere Reaktion als Keratinozyten (Recker et al., 2003).

Da methodisch in den Biopsien kein *housekeeping* Bereich definiert werden konnte, ist ein quantitativer Vergleich letztlich nicht möglich. Anhand der *in vitro* Daten lassen die *in vivo* erhaltenen Ergebnisse jedoch eher auf einen Anstieg der hCAT1- und 2-Synthese im mikrovaskulären Gefäßendothel als auf einen Abfall im Stratum granulosum schließen. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten auf mRNA-Ebene in Biopsien psoriatischer Läsionen keinen Einfluß der Erkrankung auf die hCAT2-Expression nachweisen (Bruch-Gerharz et al., 2003). Da diese Untersuchungen jedoch nicht auf Proteinebene bzw. auch nicht für hCAT1 weitergeführt wurden, bieten die hier gewonnenen Ergebnisse erstmals einen Hinweis auf eine direkte Involvierung des γ^+ -Transporters in die Psoriasis-Pathogenese.

Fazit: Es gibt Hinweise, daß die Expression des γ^+ -System in psoriatischer Haut verändert ist.

4.5 Haben die aufgeführten Erkenntnisse eine klinische Relevanz oder Einfluß auf zukünftige Therapien? (Ausblick)

Da es sich bei den durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen um Grundlagenforschung handelt, bieten diese noch keine Option für einen konkreten therapeutischen Ansatz. Es lassen sich aber durchaus verschiedene Hypothesen formulieren, die hinsichtlich der Entwicklung therapeutischer Strategien von Interesse sein könnten. So wurden verschiedene Regulationsmöglichkeiten für den Transporter gezeigt. Außerdem zeigten sich Unterschiede im Expressionsmuster in unterschiedlichen Zelltypen und es gibt erste Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen Transporter und pathogenetischer Abläufe bei der Psoriasis. Zudem ist interessanterweise, die positionelle Klonierung der Gene, die bei der atopische Dermatitis involviert sind, (Beyer et al., 2000; Bradley et al., 2002) und die chromosomale Einordnung der γ^+ -Transportergene (Albritton et al., 1992; Bowcock et al., 1993) bereits erfolgt. Durch einen Datenbankabgleich im Map Viewer von NCBI bzw. OMIM (Tabelle 4-3; Tabelle 4-3) fanden sich sowohl das atopische Dermatitis-Gen ATOP5 als auch das SLC7A1-Gen (hCAT1) auf dem langen Arm des Chromosoms 13 im Bereich 12-14 lokalisiert. Ob es sich um ein und dasselbe Gen handelt, ist zur Zeit noch nicht bekannt. Eine vollständige genetische Entschlüssel-

ung und der Sequenzvergleich des ATPD 5-Gens und SLC7A1-Gens sollten einen Aufschluss über die Homologie beider Gene geben und SLC7A1 als putatives Kandidatengen für die atopische Dermatitis ein- bzw. ausschließen.

LocusLink LocusID: [6541](#)
Symbol: SLC7A1
Description: solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y⁺ system), member 1
Position: 13q12-q14

Tabelle 4-2 Darstellung von SLC7A1/hCAT1 auf Chromosom 13.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=30502>

LocusLink LocusID: [117188](#)
Symbol: ATOD5
Description: Dermatitis, atopic, 5
Position: 13q12-q14

Tabelle 4-3 4-4 Darstellung von ATPD5/ ATOD5 auf Chromosom 13.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=46452>

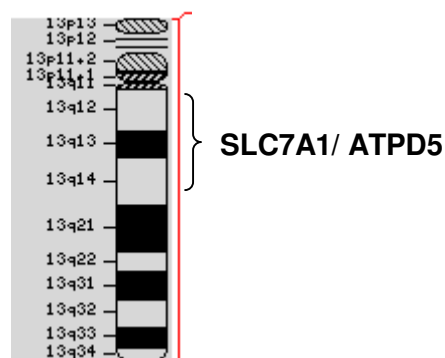


Abbildung 4.5-1 Darstellung des humanen Chromosoms 13. Die Klammer markiert den Bereich der SLC7A1- und ATPD5-Lokalisation.

Folgeuntersuchungen sollten auch beachten, daß das y⁺-System eine sehr zentrale Rolle im Zellstoffwechsel spielt, so daß dessen Beeinflussung bzw. Regulation

Einfluß auf mehrere Systeme hat. Die Strategie, NOS-Inhibitoren bzw. γ^+ -Transporthemmer für die Therapie der Psoriasis (Ormerod et al., 2000) bzw. atopischer Dermatitis (Tsukumo et al., 1999) einzusetzen, erscheint aussichtsreich und muß insbesondere in Bezug auf das γ^+ -System weiter untersucht werden.

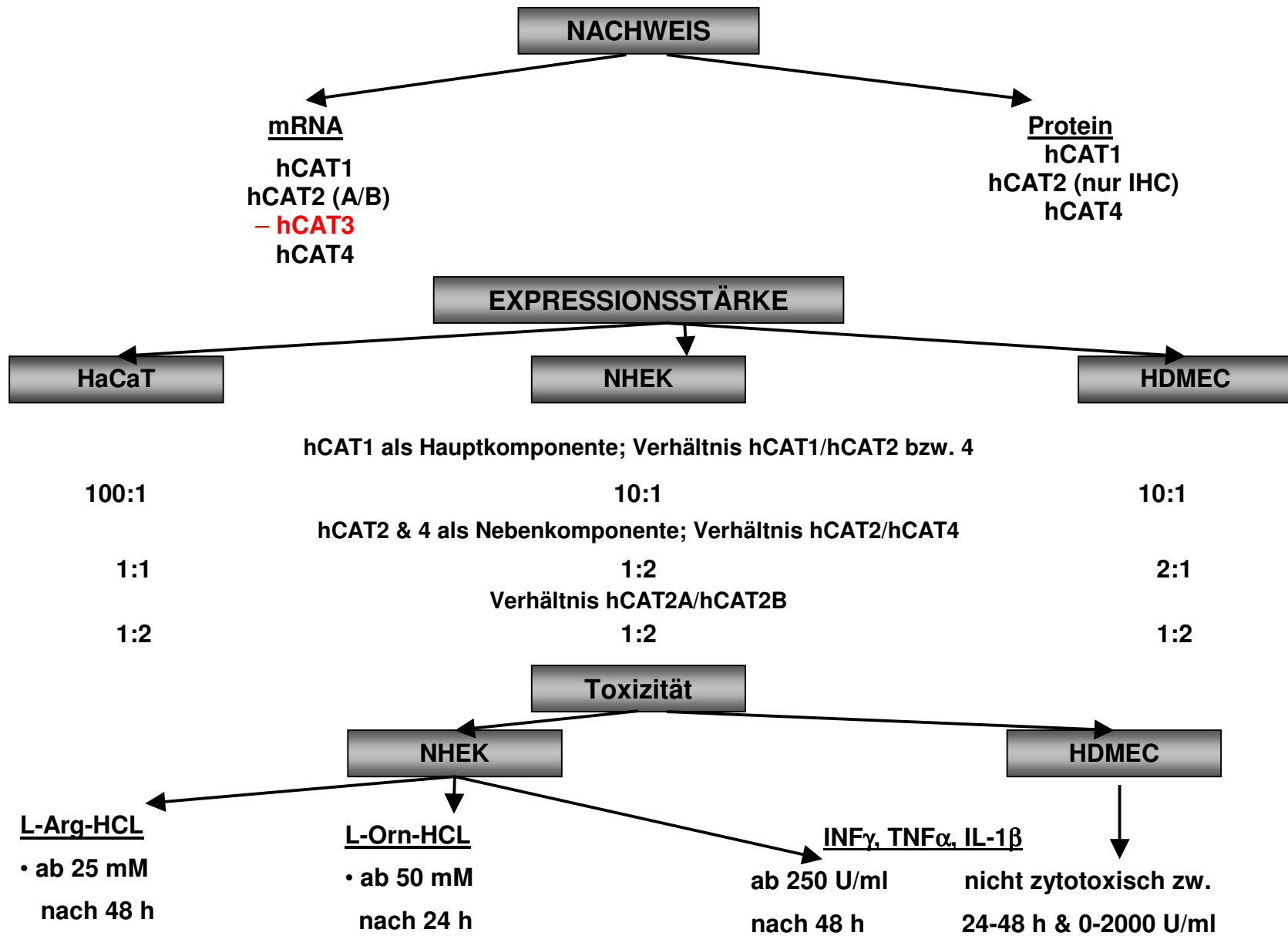
5 Zusammenfassung

1. Aminosäuren sind als Bausteine der Proteine essentiell zur Aufrechterhaltung vitaler Prozesse. Eine besondere Rolle im Zellmetabolismus der Haut spielen dabei kationische Aminosäuren, hier insbesondere L-Arginin und L-Ornithin. So ist Arginin, als semiessentielle Aminosäure an anabolischen Prozessen, wie Wachstum, Proteinsynthese und Wundheilung beteiligt. Außerdem ist L-Arginin durch die Metabolisierung zu Harnstoff und L-Ornithin für die Stickstoffbalance essentiell. Harnstoff dient in der Haut als Moistruizer und L-Ornithin als Precursor für die Synthese der proliferationsfördernden Proteine Kreatin und Polyamin (wie Spermin, Spermidin und Putrescin). All diese Effekte erfordern den Transport der Aminosäuren in die Zelle. Der in tierischen Zellen zu 60-80% durch den γ^+ -Transporter gewährleistet wird.
2. Verschiedene zellbiologische und molekularbiologische Methoden, wie Real-Time-PCR, Western Blot-Analysen, Immunhistologische Untersuchungen und Uptake-Messungen sollten einen Einblick in die Expression und Regulation des γ^+ -Transporters in kutanen Zellen (mikrovaskuläre Endothelzellen und native Keratinozyten) geben.
3. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Erkenntnisse über das γ^+ -System an mikrovaskulären Endothelzellen und nativen Keratinozyten vorhanden waren, wurde dieses zunächst über seine Transkripte in NHEK, HaCaT und HDMEC nachgewiesen. Dabei zeigten sich durch RT-PCR und Western Blot-Analysen, daß die Subtypen hCAT1, 2A, 2B und 4 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konstitutiv exprimiert werden. hCAT3 hingegen wird weder in Keratinozyten noch in mikrovaskulären Endothelzellen konstitutiv bzw. induzierbar durch Zytokine exprimiert.
4. Eine quantitative Analyse der PCR-Produkte durch Real-Time-PCR ergab, daß hCAT1 in den untersuchten Zelltypen 10-140 mal stärker als hCAT2A, B und 4 exprimiert wird. Weiterhin zeigt die quantitative Auswertung einen Unterschied in der Grundexpression von hCAT2b und 4 in NHEK und HDMEC. In HDMEC wird hCAT2b 10 mal stärker als hCAT4 exprimiert und in NHEK ist die

Expression von hCAT4 10 mal stärker als die von hCAT2b. Die Quantifizierung der hCAT2-Spliceformen ergab eine etwa zweimal so hohe Expression von hCAT2B im Vergleich zu 2A.

5. Die Inkubation der Zelltypen den zu transportierenden Aminosäuren L-Arginin und L-Ornithin sowie mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF α , IL-1 β und INF γ in HDMEC und NHEK und eine anschließende Quantifizierung der Gen- bzw. Proteinsynthese des γ^+ -Transporters sollte einen Einblick geben, ob und inwieweit das Transportsystem in diesen Zellen regulierbar ist.
6. Dabei zeigte sich, daß in NHEK L-Arginin die Expression von hCAT1 hoch und die von hCAT2 bzw. 2B und hCAT4 herunter reguliert wird. Durch die Gabe von L-Ornithin zeigte sich ein inverses Bild. Hier wird die Synthese von hCAT1 verringert und die von hCAT2/2B und hCAT4 erhöht.
7. Die Zytokine TNF α , IL-1 β und INF γ induzieren die Synthese von hCAT2a und b in HDMEC sehr stark und in NHEK jedoch nur gering. Dabei kommt es in HDMEC zu einer 30fach stärkeren Expression als in der unbehandelten Kontrolle. Auf die Expression der anderen γ^+ -Systemgene haben die Zytokine nur einen geringen Einfluß. Außerdem beeinflussten TH1-Zytokine die hCAT2B-Expression in HDMEC überadditiv.
8. Transportuntersuchungen der L-Arginin-Aufnahme in Zytokin-behandelten HDMEC sollte die Funktionsfähigkeit der hCAT2-Transporter induzierten Expression beweisen. Was durch eine verstärkte Aufnahme von L-Arginin in die Zelle bestätigt werden konnte.
9. Immunhistologische Untersuchungen an psoriatischen und gesunden Hautbiopsien sollten einen direkten Zusammenhang zwischen γ^+ -Systems und Psoriasis-symptomatik herstellen. Durch den Nachweis eines verändertes Expressionsmuster von hCAT1 und 2 in der erkrankten Haut konnte dieser belegt werden.

10. Über einen Datenbankabgleich konnte das Gen hCAT1 in einen möglichen Zusammenhang mit einem für die atopische Dermatitis assoziierten Gen (ATPD5) gebracht werden. Beide Gene sind in dem chromosomalen Abschnitt 13q12-q14 lokalisiert.



Regulation der Expression

Kationische Aminosäuren

		hCAT1	hCAT2/B	hCAT4
mRNA	L-Arg	+	-	-
	L-Orn	±	++	++
Protein	L-Arg	+	MD	-
	L-Orn	-	MD	+

TH1-Zytokine

		hCAT1	hCAT2A/B	hCAT4	
NHEK		+	++++	+	
HDMEC		-	+	-	
		INF γ	TNF α	IL1- β	Mix
hCAT2b		-	+	++	+++

Klinischer Aspekt

Verteilung von hCAT1 und 2 innerhalb der einzelnen Hautschichten

Veränderungen im Expressionsmuster von hCAT1 und 2 bei einer Psoriasis

	hCAT1		hCAT2	
	Kontrollgruppe	Psoriatiker	Kontrollgruppe	Psoriatiker
Mikrovaskuläre Endothelzellen	++++	++++	++++	+++
Stratum basale	++	++	+++	++
unteres Stratum spinosum	++	++	+++	+
oberes Stratum spinosum	++	+	+++	+
Stratum granulosum	++++	+	++++	++

6 Literaturverzeichnis

- Agner T, Serup J. Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. *Contact Dermatitis* 20: 352-359; 1989
- Akdis CA, Akdis M, Trautmann A, Blaser K. Immune regulation in atopic dermatitis. : *Curr Opin Immunol.* 12(6): 641-6.; 2000
- Alba-Roth, J, Muller OA, Schopohl J, von Werder K. Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 1186-1189; 1988
- Albritton LM, Bowcock AM, Eddy RL, Morton CC, Tseng L, Farrer LA, Cavalli-Sforza LL, Shows TB, Cunningham JM. The human cationic amino acid transporter (ATRC1): physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics* 12: 430-4; 1992
- Anderson JO and Dobson DC. 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; 1959
- Apostol AT and Tayek JA. A decrease in glucose production is associated with an increase in plasma citrulline response to oral arginine in normal volunteers. *Metabolism.* 52(11): 1512-6; 2003
- Arnal JF, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrat availability. *J Clin Invest* 95: 2565-2572; 1995
- Aulak KS, Mishara R, Zhou L, Hyatt SL, DeJong W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M. Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J Biol Chem.* 22;274(43):30424-32; 1999
- Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery.* 108(2):331-7; 1990
- Barbul A. The use of arginine in clinical practice. In: *Amino Acid Metabolism and Therapy in Health and Nutritional Disease*, edited by Cynober LA. Boca Raton FL: CRC, p 361-372; 1995

- Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Meßmer UK, Mühl H, Pfeilschifter J. Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 202: 645-653; 1999
- Beyer K, Nickel R, Freidhoff L, Bjorksten B, Huang S-K, Barnes KC, MacDonald S, Forster J, Zepp F, Wahn V, Beaty TH, Marsh DG, Wahn U. Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers. *J Invest Dermatol* 115: 906-8; 2000
- Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Mann GE. Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J Physiol* 490(1): 229-241; 1996
- Bowcock AM, Gerken SC, Barnes RI, Shiang R, Jabs EW, Warren AC, Antonarakis S, Retief AE, Vergnaud G, Leppert M, Lalouel JM, White RL, Cavalli-Sforza L. The CEPH consortium linkage map of human, chromosome 13. *Genomics* 16: 486-496, 1993
- Bradley M, Soderhall C, Luthman H, Wahlgren C-F, Kockum I, Nordenskjold M. Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population. *Hum. Molec. Genet.* 11: 1539-1548, 2002.
- Brittenden J, Heys SD, Ross J, Eremin O. Natural killer cells and malignant disease. *Cancer* 77: 1226-1243; 1996
- Brittenden J, Heys SD, Eremin O. Immunological properties of L-arginine. In: Eremin O. (ed) L-Arginine: Biological aspects and clinical application. Springer Verlag, New York, 79-113; 1997
- Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Do Nascimento CA, Burewicz A, Malinski T. Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J Physiol Pharmacol.* 50(4):575-86; 1999
- Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol.* 110:1-7, 1998
- Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol.* 162(1):203-11; 2003
- Chan VT, Zhang DN, Nagaravapu U, Hultquist K, Romero LI, Herron GS. Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial

- cells: expression and morphogenetic correlation. *J Invest Dermatol.* 111(6):1153-9; 1998
- Chen TR In situ demonstration of mycoplasma contamination in cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 104:255-262; 1977
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9; 1987
- Christensen HN, Antonioli JA. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J Biol Chem* 25: 1497-1504; 1969
- Closs EI, Albritton LM, Kim JW, Cunningham JM. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem* 268, 7538-7544; 1993
- Closs EI, Gräf P, Habermeier A, Cunningham JM, Förstermann U. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochem* 36, 6462-8; 1997
- Closs EI, Graf P. Cationic amino acid transporters (CATs). Targets for the manipulation of NO-synthase activity? *Pharm Biotechnol.*12:229-49; 1999
- Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol.* 57(1):68-74; 2000
- Collarani EJ, Oxender DL. Mechanism of transport of amino acid across membranes. *Ann Rev Nutr* 7, 75-90; 1987
- Crouse RG, Rothberg S: Evaluation of the enzymes of the krebs-henseleit cycle in human epidermis. *J Invest Dermatol* 36:287-292; 1961
- deNigris F, Lerman LO, Ignarro SW, Sica G, Lerman A, Palinski W, Ignarro LJ, Napoli C. Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4;100(3):1420-5; 2003
- DeGeorge GL, Heck DE, Laskin JD. Arginine metabolism in keratinocytes and macrophages during nitric oxide biosynthesis. *Biochem Pharmacology* 54, 103-112; 1997
- Deves R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (γ +L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol.* 454:491-501; 1992

- Devés R and Boyd CAR. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Review* 78 (2), 487-545; 1998
- Ding A, Hwang S, Lander HM, Xie QW. Macrophages derived from C3H/HeJ (Lpsd) mice respond to bacterial lipopolysaccharide by activating NF-kappa B. *J Leukoc Biol.* 57(1):174-9; 1995
- Dye JF, Vause S, Johnston T, Clark P, Firth JA, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *FASEB* 3; 10.1096/fj.02-0916fje; 2003
- Eberhardt W, Kunz D, Hummel R, Pfeilschifter J. Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 25;223(3):752-6; 1996
- Feelisch M, Stammler SJ. *Methods in nitric oxid research.* Wiley Inc. Chichester; 1996
- Figuroa XF, Martinez AD, Gonzalez DR, Jara PI, Ayala S, Boric MP. In vivo assessment of microvascular nitric oxide production and its relation with blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(3): H1222-31; 2001
- Finley KD, Kakuda DK, Barrieux A, Kleeman J, Huynh PD, MacLeod CL. A mammalian arginine/lysine transporter uses multiple promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;92(20):9378-82; 1995
- Geiser T. Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease *Schweiz Med Wochenschr.* 10;129(14):540-6; 1999
- Gong SS, Guerrini L, and Basilico C. Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol.* 11(12):6059-66; 1991
- Hammermann R, Dreißig MDM, Mössner J, Fuhrmann M, Berrino L, Göthert M, Racké K. Nuclear factor NF- κ B mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxid synthase and up-regulation of the cationic amino acid transporter cat-2b in rat alveolar macrophages. *Mol Pharmacol* 58:1294-1302; 2000
- Hausmann S, Wucherpfennig KW. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Curr Opin Immunol* 9:831-838;1997
- Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(21):8612-6; 1990

- Heys SD, Broom J, Eremin O. L-Arginine: biochemistry and basic biology. In: Eremin O. (ed) L-Arginine: Biological aspects and clinical application. Springer, New York, S.1-25; 1997
- Hibbs JB (jr), Taintor RR, Vavarin Z, Rachlin EM, Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157 (1): 87-94; 1988
- Hoshida R, Ikeda Y, Karamshima S, Matsuura T, Komaki S, Kishino T, Niikawa N, Endo F, Matsuda I. Molecular cloning, tissue distribution; and chromosomal localization of human cationic amino acid transporter2 (HCAT2) *Genomics* 38: 174-178; 1996
- Hosokawa H, Sawamura T, Kobayashi S, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. Cloning and characterization of a brain-specific caionic amino acid transporter. *272* (13) p.8717-8722; 1997
- Hosokawa H, Ninomiya H, Sawamura T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Fujiwara K, Masaki T. Neuron-specific expression of cationic amino acid transporter 3 in the adult rat brain. *Brain Research* 838, p. 158-165; 1999
- Hyatt SL, Aulak KS, Malandro M, Kilberg MS, Hatzoglou M. Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. *J Biol Chem.* 8; 272 (32) :19951-7; 1997
- Ibelgaufs H. *Gentechnologie von A bis Z. Studenausgabe-Weinheim, VHC; 1990*
- Inuoe Y, Bode BP, Beck DJ, Li AP, Bland KI, Souba WW. Arginine transport in human liver. Characterization and effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Ann Surg.* 218 (3): 350-62; 1993
- Irie K, Tsukahara F, Fujii E, Uchida Y, Yoshioka T, He WR, Shitashige M, Murota S, Muraki T. Cationic amino acid transporter-2 mRNA induction by tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 27;339(2-3):289-93; 1997
- Ito K, Groudine M. A new member of cationic amino acid transporter familiy is preferentially expressed in adult mouse brain. *272* (42), p. 26780-26786; 1997
- Jenkinson CP, Grigor MR. Rat mammary arginase: isolation and characterization. *Biochem Med Meta Biol* 51, 156-165; 1994
- Kakuda DK, Finley KD, Dionne VE, MacLeod CL. Two distinct gene products mediate γ -type cationic amino acid transport in *Xenopus* oocytes and show different tissue expression pattern. *Transgene* 1, 91-101; 1993

- Kakuda DK, Sweet MJ, MacLeod CL, Hume DA, Markovich D. CAT-2 mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem J.* 340, 549-553; 1999
- Kawahara K, Gotoh T, Oyadomari S, Kajizono M, Kuniyasu A, Ohsawa K, Imai Y, Kohsaka S, Nakayama H, Mori M. Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* Jun 20;90(2):165-73; 2001
- Kim JW, Gloss EI, Albritton LM, Cunningham JM. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature.* 22;352(6337):725-8; 1991
- Kim H, Lee HS, Chang KT, Ko TH, Baek KJ, Kwon NS. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor-kappa B. *J Immunol.* 1;154(9):4741-8; 1995
- Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery.* 114(2):155-160; 1993
- Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med.* 15;317(16):985-90; 1987
- Kolitz JE, Mertelsman R. The immunotherapy of human cancer with interleukin-2 present status and future directions. *Cancer Invest.* 9: 529-542; 1991
- Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kroncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 111(2):286-91; 1998
- Kurz S and Harrison DG. Insuline and the arginine paradox. *J Clin Invest* 99 (3): 369-370; 1997
- Laine RO, Shay NF, Kilberg MS. Nuclear retention of the induced mRNA following amino acid-dependent transcriptional regulation of mammalian ribosomal proteins L17 and S25. *J Biol Chem.* 1;269(13):9693-7; 1994
- Lancaster J. Nitric oxid. Academic press, San Diego, 1996
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate

- induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15;90(20):9730-4; 1993
- MacLeod CL. Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 24,846-52; 1996
- MacLeod CL and Kakuda DK. Regulation fo CAT: cationic amino acid transporter gene expression. *Amino Acids* 11: 171-191; 1996
- Manner CK, Nicholson B, MacLeod CL. CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO production in astrocytes. *J Neurochem.* 85(2):476-82; 2003
- Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB J.* 8(8):538-44; 1994
- Marton LJ and Morris DR. Molecular and cellular functions of polyamines. In: McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsman A (eds.), *Inhibition of polyamine metabolism: Biological Significance and basis of new therapies*. S. 79-105, Orlando, FL: Academic Press, 1987
- Mason JC, Yarwood H, Tarnok A, Sugars K, Harrison AA, Robinson PJ, Haskard DO. Human Thy-1 is cytokine-inducible on vascular endothelial cells and is a signaling molecule regulated by protein kinase C. *J Immunol.* 15;157(2):874-83; 1996
- McAllister RJ, Benjamin N. L-arginine and nitric oxide system. In: Eremin O. (ed) *L-Arginine: biological aspects and clinical application*. Springer Verlag, New York, p 79-113; 1997
- McCall CA, Cohen JJ. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J Invest Dermatol* 97 (1): 111-4; 1991
- McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A calveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endotehlial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 272 (50) : 31213-16; 1997
- Mori M and Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 7;275(3):715-9. Review; 2000
- Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 1;163(7):3771-7; 1999

- Nathan C. Nitric oxid as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* &: 3051-3064; 1992
- Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med.* 1;176(6): 1583-93; 1992
- Nicholson B, Sawamura T, Masaki T, MacLeod CL. Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines. *J Biol Chem.* 12;273(24):14663-6; 1998
- Nicholson B, Manner CK, Kleeman J, MacLeod CL. Sustained nitric oxid production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *JBC* 276 (19), 15881-85; 2001
- Ormerod AD, Copeland P, Shah SA. Treatment of psoriasis with topical NG-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Br J Dermatol.* 142(5):985-90; 2000
- Pain VM. Translational control during amino acid starvation. *Biochimie. Review.* 76(8):718-28; 1994
- Perkins CP, Mar V, Shutter JR, del Castillo J, Danilenko DM, Medlock ES, Ponting IL, Graham M, Stark KL, Zuo Y, Cunninham JM, Bosselmann RA. Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT. *Genes Dev.* 11, 914-25; 1997
- Prinz JC, Gross B, Vollmer S, Trommler P, Strobel I, Meurer M, Plewig G. T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation in vitro. *Eur J Immunol* 24:593-598; 1994
- Prinz JC. Psoriasis vulgaris--a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 26(4):326-32; 2001
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 11;23(23):4878-84; 1995
- Ratner S: Enzymes of arginine and urea synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 39:1-90; 1973
- Recker K, Klapperstuck T, Kehlen A, Wohlrab J. The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin. *J Invest Dermatol.* 121(6):1552-3; 2003

- Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 312(1):31-7; 1994
- Richard L, Velasco P, Detmar M. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 10;240(1):1-6; 1998
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 20;230(4732):1350-4; 1985
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7; 1977
- Saura M, Zaragoza C, Bao C, McMillan A, Lowenstein CJ. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. *J Mol Biol.* Jun 11;289(3):459-71; 1999
- Schnorr O, Suschek CV, Kolb-Bachofen V. The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin. *J Invest Dermatol.*120(6):1016-22; 2003
- Scorsone KA, Panniers R, Rowlands AG, Henshaw EC. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 during physiological stresses which affect protein synthesis. *J Biol Chem.* 25;262(30):14538-43; 1987
- Segel GB, Tometsko AM, Lichtman MA. Y⁺- and L-system amino acid transport in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes: photoinhibition by fluoronitrophenylazide. *Arch Biochem Biophys* 242: 347-354; 1995
- Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KF. Seyffert Lehrbuch der Genetik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1998
- Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM, Ignarro LJ. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 31;191(3):1301-8; 1993
- Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE Jr. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science.* 11;258(5089):1808-12; 1992
- Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature.* 9;366(6455):583-5; 1993

- Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE. Activation of L-arginine transport (system y^+) and nitric oxid synthase by elevated glucose and insuline in human endothelial cells. *J Physiol* 490, 775-781; 1996
- Sperandeo MP, Borsani G, Incerti B, Zollo M, Rossi E, Zuffardi O, Castaldo P, Tagliatela M, Andria G, Sebastio G. The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics* 49 : 230-36; 1998
- Stefano GB and Magazine HI. Nitric oxide autoregulation and ist significance. *Mod Asp Immunobiol* 1 (5): 182-186; 2001
- Swerlick RA and Lawley TJ. Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J Invest Dermatol* 100: 111-115; 1993
- Tsukumo Y, Andoh T, Yamaguchi T, Nojima H, Kuraishi Y. Involvement of nitric oxide in itch-scratch response of NC mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 114 Suppl 1:17P-21P; 1999
- Van Winkle LJ, Christensen HN, Campione AL. Na^+ -dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem*. 5;260(22):12118-23; 1985
- Vekony N, Wolf S, Boissel JP, Gnauert K, Closs EI. Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissue. *Biochem*. 40, 12387-94, 2001
- Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC. T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 24:2377-2382; 1994
- Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 22; 352 (6337): 729-31; 1991
- Williams-Asham HG, Pegg AE. Aminopropyl group transfers in polyamine biosynthesis. In: Morris DR, Marton LJ. *Polyamines in Biology and Medicine*. Marcel Dekker, New York, p 43-72; 1981
- Wolf S, Janzen A, Vekony N, Martine U, Strand D, Closs EI. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. 364: 767-775; 2002

- Xiao S, Wagner L, Mahaney J, Baylis C. Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. *Am J Renal Physiol* 280: F989-995; 2001
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 18;269(7):4705-8; 1994
- Xie H, Seward RJ, Huber BT. Cytokine rescue from glucocorticoid induced apoptosis in T cells is mediated through inhibition of IkappaBalpha. *Mol Immunol.* 34(14):987-94; 1997
- Zhang X, Laubach VE, Alley EW, Edwards KA, Sherman PA, Russell SW, Murphy WJ. Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukoc Biol.* 59(4):575-85; 1996

Anhang

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

hCAT1 (For)	5'GATTTAGGTGACACTATAGAATACATCTGCTTCATCGCCTACTT'3
(Rev)	5'TAGCAGTCCATCCTCAGCCATG'3
hCAT2 (For)	5'TTGCAACAACCTGGTGAAG'3
(Rev)	5'TTCAGGTCAAACAGAAAGG'3
hCAT2b(For)	5'GATTTAGGTGACACTATAGAATACCCCAATGCCTCGTGTAATCT'3
(Rev)	5'TGCCACTGCACCCGATGATAAAGT'3
hCAT3 (For)	5'ACCCTGATGATGCCTTACTACC'3
(Rev)	5'CCATCCTCTGCCATCGCGTAG'3
hCAT4 (For)	5'GATTTAGGTGACACTATAGAATACATGGTGGGCTCGGGTCTCTA'3
(Rev)	5'TGCGGATGCTGTGGCTGAAC'3

Sequenzen der verwendeten Antikörper

hCAT1-	(C)QMLRRKVVDCSREETRLSR-30	(NP003036.1, XP 007137.1, P30825)
hCAT2-	RDENNEEDAYPDNVHAAEEK-611	(CAT2-BAA06271.1(D29990, 52569, CTR2_HUMAN)
hCAT4-	GYGIRHSKENQRELPGLN-585	(HUMAN CAT4-O43246 CTR4_HUMAN in Swiss Prot)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Recker
Vorname	Kristin
Geburtsdatum	20.04.77
Geburtsort	Halle/Saale
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbesuche

09.1983 bis 01.1991	POS „Fritz Große“, Halle
02.1991 bis 08.1991	Schule „Am Brühl“, Halle
09.1991 bis 05.1995	„Elisabeth-Gymnasium“, Halle

Abschluss: Abitur

Studium

10.1995 bis 09.1997	Grundstudium der Biologie an der MLU Halle-Wittenberg
10.1997 bis 07.2000	Hauptstudium der Biologie an der MLU Halle-Wittenberg

Hauptfach: Genetik
1. Nebenfach: Mikrobiologie
2. Nebenfach: Biochemie
3. Nebenfach: 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 Signalweges"
---------------------	---

Abschluss: Diplom-Biologe

Praktikum

09.2000 bis 02.2001

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

Dissertation

03.2001 bis voraussichtl.

02.2004

Promotion zum Dr. rer. nat. an der MLU Halle-Wittenberg, in der Klinik für Dermatologie und Venerologie bei Prof. Dr. W. Wohlrab, Thema: „Expression und Regulation des γ^+ -Systems in kutanen Zellen“

Halle,

Kristin Recker

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und versichere, daß ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, ohne deren Hilfe diese Arbeit so nicht oder nur erschwerter möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. J. Wohlrab und bei Prof. Dr. rer. nat. W. Wohlrab für die fachliche Betreuung bedanken und insbesondere dafür, daß sie es mir ermöglicht haben, meinen wissenschaftlichen Weg in der medizinischen Forschung fortzusetzen.

Frau Hölsken danke ich für die super Zellen, den leckeren Kuchen (der ist wirklich gut) und für die liebe Arbeitsatmosphäre. Ohne sie wäre es ganz schön leise und nicht so lustig und herzlich gewesen.

Frau Schramm danke ich für die Unterstützung bei meinen radioaktiven Versuchen, wenn es mir zu heiß wurde, ist sie eingesprungen.

Für die fachlichen Gespräche und die Unterstützung bei meiner Publikation danke ich Herrn Dr. T. Klapperstück.

Bei Dr. Astrid Kehlen möchte ich mich für die fachliche Unterstützung in Real-Time-PCR- und molekularbiologischen Fragen bedanken.

Bei Sandra Otto und den Histo-Damen bedanke ich mich für die Bewertung und Färbung der histologischen Präparate.

Christoph, Ferdy, Dana, Micha, Matthi und vielen anderen (die kamen und leider z.T. auch wieder gingen) danke ich für die super Arbeitsatmosphäre.

Es war eine schöne Zeit bei Euch!

Natürlich möchte ich auch der DFG und den Mitgliedern des Graduiertenkollegs - Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen für die finanzielle Unterstützung und die wissenschaftlichen Kooperation danken.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht zum Schluß an meine Familie und meine Freunde!!!