

Titelblatt

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Komm. Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

**Die Bedeutung kationischer Aminosäuretransporter für den
L-Arginin-Metabolismus bei Psoriasis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Maximilian Schuier

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Joachim Windolf
 Dekan

Referent: Emeritus Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

Koreferent: Universitätsprofessor Dr. med. Jean Krutmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Physiologie der Haut	1
1.2. Pathophysiologie und Therapie der Psoriasis vulgaris.....	2
1.3. Bedeutung des L-Arginin-Metabolismus für die Zellhomöostase	6
1.3.1. Rolle von L-Arginin und Stickstoffmonoxid (NO [•]) für die Zellhomöostase.....	6
1.3.2. Regulation und Bedeutung der durch die iNOS vermittelten NO [•] -Synthese.....	7
1.3.3. Regulation des durch die Arginase mediierten L-Arginin-Metabolismus ...	8
1.3.4. Koexpression von iNOS und Arginase-1 führt zu einer Substratkonkurrenz.....	8
1.4. L-Arginin-Transport durch die kationischen Aminosäuretransporter (hCAT) ...	9
1.4.1. Struktur und Funktion	9
1.4.2. Rolle des L-Arginin-Transports durch die hCAT in der Haut.....	11
1.5. Ziele der Arbeit	14
2. Materialien und Methoden	15
2.1. Materialien.....	15
2.1.1. Chemikalien und sonstige verwendete Materialien	15
2.1.2. Zytokine und Enzyme	15
2.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur	15
2.1.4. Gerät, Materialien und Reagenzien für die Real-time-PCR	15
2.1.5. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	16
2.2. Methoden.....	17
2.2.1. Zellkultur.....	17
2.2.2. Zytokinaktivierung	17
2.2.3. UV-B-Bestrahlung	17
2.2.4. RNA-Isolierung, RNA-Konzentrationsbestimmung und cDNA-Synthese	17
2.2.5. Prinzip, Pipettierschemata und Protokolle der Real-time-PCR.....	18
2.2.6. Bestimmung und Bedeutung des <i>Crossing Point</i> (Cp.).....	22
2.2.7. Identifizierung der Real-time-PCR-Amplifikate	23

Inhaltsverzeichnis

2.2.7.1. Schmelzkurvenanalyse und Schmelzpunktanalyse	23
2.2.7.2. Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.7.3. Sequenzierung	24
2.2.8. Quantifizierung der Expressionsunterschiede mittels „RelQuant“	24
2.2.9. Bestimmung der Arginaseaktivität mittels Harnstoffmessung	25
3. Ergebnisse.....	26
3.1. Klinische Parameter zu den Biopsien der Psoriasis-Patienten und von gesunden Probanden.....	26
3.2. Untersuchungen zur mRNA-Expression kationischer Aminosäuretransporter (hCAT) in psoriatischer Haut.....	26
3.2.1. Deutlich erhöhte hCAT-1-mRNA-Expression.....	28
3.2.2. Der „Leber-Typ“ hCAT-2A wird sowohl in gesunder als auch in psoriatischer Haut exprimiert.....	28
3.2.3. Keine hCAT-2B-mRNA-Induktion in psoriatischer Haut.....	28
3.3. Kontrolle der PCR-Amplifikate am Beispiel von hCAT-2B	29
3.3.1. Spezifisches Amplifikat in Schmelzkurven- und Schmelzpunktanalyse ...	29
3.3.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	30
3.3.3. Sequenzierung.....	31
3.4. Die in psoriatischer Haut am stärksten exprimierte hCAT-Isoform ist hCAT-1.....	32
3.5. Untersuchungen zum Einfluss von UV-B-Licht auf den L-Arginin-Metabolismus menschlicher Keratinozyten.....	33
3.5.1. Induktion der hCAT-2B-mRNA-Expression nach Zytokinaktivierung und UV-B-Bestrahlung	34
3.5.2. Die hCAT-1-mRNA-Expression wird durch UV-B gehemmt.	35
3.5.3. UV-B und Zytokinaktivierung hemmen die Expression der Arginase-1 und die Arginaseaktivität.	36
4. Diskussion.....	39
4.1. Bedeutung der hCAT-Expression für die Substratkonkurrenz von iNOS und Arginase-1 in der Psoriasis	39
4.1.1. Mögliche Mechanismen und Auswirkungen der hCAT-1-mRNA-Induktion.....	40
4.1.2. Relevanz der hCAT-2A-mRNA-Expression.....	43

Inhaltsverzeichnis

4.1.3. Fehlende hCAT-2B-Induktion als vermutete Ursache einer Substratarmut der iNOS in psoriatischen Läsionen.....	44
4.2. Effekte von UV-B-Bestrahlung auf den L-Arginin-Metabolismus in menschlichen Keratinozyten	46
4.2.1. Effekte auf die Substratverfügbarkeit der iNOS durch UV-B-abhängige hCAT-2B-mRNA-Induktion.....	46
4.2.2. UV-B-induzierte Arginasehemmung als möglicher Mechanismus einer erhöhten L-Arginin-Verfügbarkeit für die iNOS	47
4.3. Ausblick.....	49
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	51
7. Anhang.....	56
Abkürzungen.....	56
Abbildungsverzeichnis.....	58
Tabellenverzeichnis	59
Publikationen und Kongressbeiträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit.....	60
Danksagung.....	61
Lebenslauf.....	62
Erklärung.....	65

1. Einleitung

1.1. Physiologie der Haut

Die menschliche Haut besteht von außen nach innen aus den Schichten Epidermis, Dermis und Subcutis. Die Epidermis besteht aus verhornendem Plattenepithel und bildet die äußere Grenzschicht der Haut. Durch die Basallamina getrennt liegt die Dermis als bindegewebiges und kollagenreiches Gerüst unter der Epidermis. Diese Hautschicht bildet durch ihre starke Vaskularisierung und Innervation den Versorgungsteil der Haut. Die Subcutis ist ein abschließendes Fettpolster.

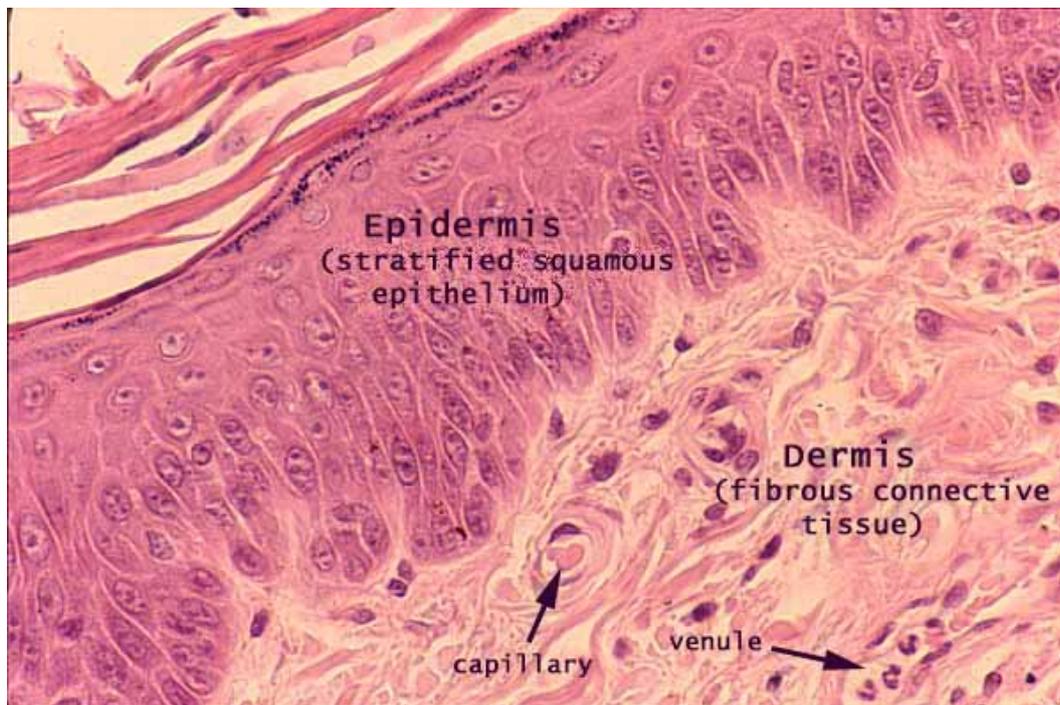


Abb. 1.1. Histologie der Epidermis und Dermis

Die Abb. zeigt die Histologie gesunder menschlicher Haut. In der Epidermis sind Keratinozyten zu sehen, die nach außen wandern, absterben und als Korneozyten die Hornschicht der Epidermis bilden. Die Dermis besteht aus Fibroblasten, kollagenem Bindegewebe, elastischen Fasern und ist von vielen Blutgefäßen durchzogen.

Für die Epidermis ist eine hohe Rate an Degeneration wie auch an Regeneration von Keratinozyten charakteristisch. Die Keratinozyten wandern von innen nach außen durch die Epidermis und bilden schließlich als abgestorbene Zellen, nun Korneozyten genannt, die Hornschicht. Neben der regenerativen und mechanisch schützenden Funktion übernimmt die

Einleitung

Epidermis auch Aufgaben des Immunsystems. In der Epidermis befinden sich in größerer Anzahl Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen.

In der Dermis befinden sich viele Fibroblasten, die Kollagenfasern und elastische Fasern produzieren. Diese Fasern bilden das Grundgerüst der Dermis, welche von vielen Gefäßen durchzogen ist. Neben der Blutversorgung der Epidermis übernimmt die Dermis die Thermoregulation über die Haut.

Die Histologie der Subcutis zeigt hauptsächlich ausgereifte Adipozyten, Schweißdrüsen, und Haarfollikel.

1.2. Pathophysiologie und Therapie der Psoriasis vulgaris

Psoriasis vulgaris, auch als Schuppenflechte bezeichnet, ist mit einer Prävalenz von ca. 2 % in Westeuropa¹ eines der häufigsten dermatologischen Krankheitsbilder. Makroskopisch ist die Psoriasis primär durch symmetrische, scharf begrenzte, erythematöse Läsionen mit silbrig schilfernder Oberfläche gekennzeichnet.

Diese stark entzündeten und teils blutenden Läsionen, auch als Plaques bezeichnet, treten vorwiegend an den Extensorflächen der Gliedmaßen, aber auch an anderen Stellen der Körperoberfläche auf (Abb. 1.2.).



Abb. 1.2. Makroskopisches Bild einer typischen psoriatischen Läsion in der Knieregion

Die psoriatische Läsion zeigt eine klare Abgrenzung zum nicht entzündeten Gewebe. Die Oberfläche ist deutlich gerötet, blutig und zeigt silbrig schilfernde Verhornungen.

Die Ätiologie dieser primär autoimmunen Erkrankung ist nicht vollständig geklärt.

Bekannt ist eine genetische Disposition², sowie Provokationen durch chemische, physikalische und entzündliche Stimuli. Auch können endogene Noxen wie Infektionen, der Umstand einer Schwangerschaft oder akute Stresssituationen am Ausbruch des akuten Krankheitsbildes beteiligt sein³. Es werden zwei Typen der Psoriasis unterschieden.

Einleitung

Der familiäre Typ 1 Psoriasis ist charakterisiert durch Krankheitsauftreten vor dem 40. Lebensjahr mit starker Assoziation zu den *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Genen. Typ 2 Psoriasis ist nicht-familiär bedingt und manifestiert sich nach dem 40. Lebensjahr⁴.

Die Psoriasis ist gekennzeichnet durch eine hohe Proliferationsrate der epidermalen Keratinozyten bei einer gleichzeitig bestehenden lokalen Entzündungsreaktion. Es kommt zu den typischen makroskopisch sichtbaren erythematösen Läsionen. Begleitet wird diese Hyperproliferation und Entzündungsreaktion von einer erhöhten dermalen Mikrovaskularisierung⁵.

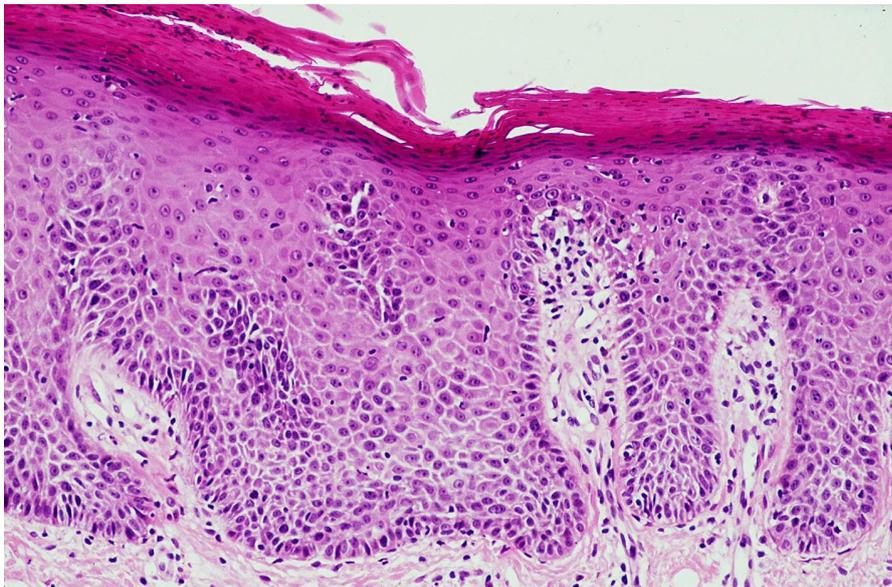


Abb. 1.3. Histologie eines psoriatischen Plaques zeigt eine epidermale Hyperproliferation.

Die Histologie der Psoriasis ist durch eine hohe Proliferationsrate der epidermalen Keratinozyten, die in diesem Schnitt dunkel gefärbt sind, gekennzeichnet. Im Vergleich zu gesunder Haut (vgl. mit Abb. 1.1.) ist auch die Struktur der Epidermis verändert. Typisch für die Psoriasis sind die zapfenförmigen Einstülpungen der Epidermis in die Dermis. Eingewanderte, dunkel gefärbte Entzündungszellen lassen sich in diesem Schnitt schwer von den Keratinozyten unterscheiden.

Abb. 1.3. zeigt die Histologie eines psoriatischen Plaques. Charakteristisch für die Psoriasis sind die zapfenförmigen Einstülpungen der Epidermis. Die klare horizontale Abgrenzung von Epidermis und Dermis ist verloren gegangen (vgl. mit Abb. 1.1.).

Weitere Manifestationen der Psoriasis sind die psoriatische Arthritis (PsA) bei ca. 5 % der Psoriasispatienten⁶ und die sehr seltene Psoriasis pustulosa. Die PsA ist gekennzeichnet durch eine Oligo-/Polyarthrit, die als peripherer Typ kleine distale Gelenke an Händen und Füßen befällt. Der zentrale Typ manifestiert sich am Achsenskelett und zeigt typischerweise Symptome einer Sakroiliitis⁷. Die pustulöse Form als besonders schweres und akutes Krankheitsbild ist eine seltene Sonderform der Psoriasis mit Pustelbildung auf gerötetem

Einleitung

Hautgrund am ganzen Körper. Weitere Komplikationen können Fieber, sowie Störungen der Thermoregulation und des Flüssigkeitshaushalts sein.

Alle Formen der Psoriasis gehen für die betroffenen Patienten mit einer deutlichen subjektiven Reduktion der Lebensqualität einher und führen häufig zu Depressionen⁸.

Die primären Modulatoren der Pathogenese der Psoriasis vulgaris scheinen aktivierte T-Lymphozyten zu sein. Es konnten sowohl in psoriatischen Läsionen, wie auch im Blut der Patienten, erhöhte Zahlen an T-Lymphozyten, sowie dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden⁹. Pathobiochemisch können deutliche Veränderungen der Zytokinverhältnisse von läsionaler zu nicht-läsionaler bzw. gesunder Haut beobachtet werden. Die Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) sind in läsionaler Haut deutlich erhöht¹⁰. Auf mRNA-Ebene konnte eine Induktion proinflammatorischer Gene (u.a. CD25, IFN- γ , IL-12, iNOS) gezeigt werden¹¹.

Therapiert werden die Symptome vorwiegend topisch (UV-B-Licht / Keratinolytika und Corticosteroide)¹², aber auch systemisch (Cyclosporine / Retinoide).

Besonders gute Erfolge zeigen Kombinationstherapien wie die PUVA-Therapie (Psoralen plus UV-A-Licht [$\lambda=320-400$ nm])¹³. Psoralen wird dem Patienten vor der Bestrahlung mit UV-A appliziert und sensibilisiert die Haut für das UV-A-Licht. Bei dem Großteil der Patienten verbessert sich die Symptomatik auch während der Sommermonate durch Sonnenexposition.

Patienten des Hauttyps I und II (hellhäutig und starke Disposition zu UV-Schäden), den vorherrschenden Hauttypen in Westeuropa, werden überwiegend mit UV-B-Bestrahlung ($\lambda=280-320$ nm) behandelt, da auch hier gute Therapieerfolge wie bei der PUVA-Therapie beobachtet werden. Der Vorteil gegenüber der PUVA-Therapie besteht außerdem darin, dass auf eine orale bzw. systemische Gabe von Psoralen verzichtet werden kann. Die UV-B-Therapie ist somit ärmer an schädlichen Nebenwirkungen (Verminderung des Auftretens von Erythemen und DNA-Schäden). Ein Nachteil dieser Therapie sind höhere Kosten durch die Verwendung aufwändigerer, sowie neuerer Lampen und Laser. Die Bestrahlung der Patienten mit UV-B-Licht erfolgt dreimal bis fünfmal pro Woche, abhängig vom Schweregrad der Psoriasis. Um der Entstehung von Erythemen vorzubeugen, werden über den Therapiezeitraum von zwei bis drei Monaten Dosissteigerungen bei eventuellen Anpassungen der Frequenzlänge des UV-B-Lichtes vorgenommen. Diese Therapie kann bei Patienten mit stärker pigmentierter Haut weniger effektiv sein. Abb. 1.4. zeigt die deutliche klinische Besserung eines typischen psoriatischen Plaques am Ellbogen nach UV-B-Therapie.

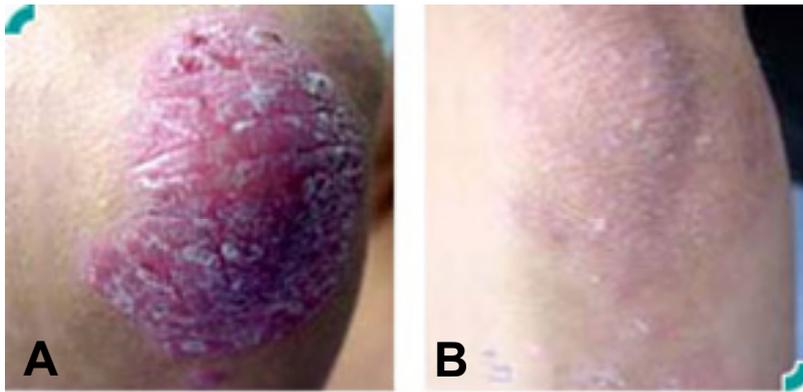


Abb. 1.4. Remission eines psoriatischen Plaques nach UV-B-Bestrahlungstherapie

Ein typischer psoriatischer Plaque am Ellbogen des Patienten (A) zeigt nach UV-B-Bestrahlung eine fast komplette Remission (B).

Der Nachteil dieser Methode liegt in einem möglichen zusätzlichen Risiko, durch UV-B-Bestrahlung Hauttumore zu entwickeln. Erste retrospektive Studien haben dafür jedoch keine Beweise erbracht¹⁴.

Die gängigen Therapieformen der Psoriasis stützen sich alle auf eine Besserung der Symptome durch eine Hemmung der Immunantwort. Eine kurative Therapie steht bis zum heutigen Zeitpunkt nicht zur Verfügung.

Zur klinischen Einteilung der Schweregrade wird für jeden Patienten ein PASI-Score (*Psoriasis Area Severity Index*) errechnet, der eine Relation zwischen befallener Körperoberfläche und dem Schweregrad der Plaques darstellt. Der PASI wurde 1978 von Fredriksson und Pettersson als eine einfache, schnelle und hochreproduzierbare Methode entwickelt¹⁵.

Dieser Index ist die bis zum heutigen Tage am häufigsten verwendete Methode zur Charakterisierung der Psoriasis. PASI-Scores reichen von 0 bis 75. Der Großteil der Patienten liegt in einem PASI-Bereich von 0 bis 15, besonders schwere Fälle erreichen einen PASI bis 40. Eine Besserung der klinischen Symptomatik während und nach Therapie wird über die prozentuale Veränderung des PASI, das Delta PASI, gemessen.

Zusammengefasst handelt es sich bei der Psoriasis um eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die durch hyperproliferierende und entzündete Keratinozytenplaques gekennzeichnet ist. Um die molekulare Pathophysiologie besser zu verstehen, ist die Kenntnis anaboler, kataboler sowie inflammatorischer Stoffwechselwege und deren Enzyme von pathogenetischer Bedeutung.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere der intrazelluläre Metabolismus der Aminosäure L-Arginin zu berücksichtigen, da dieser einen entscheidenden Einfluss auf die Zellproliferationshomöostase hat.

1.3. Bedeutung des L-Arginin-Metabolismus für die Zellhomöostase

1.3.1 Rolle von L-Arginin und Stickstoffmonoxid (NO[•]) für die Zellproliferation

Für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Zellhomöostase ist die semiessentielle Aminosäure L-Arginin von großer Bedeutung, da sie sowohl für die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) als auch für die Arginasen das Substrat darstellt¹⁶.

L-Arginin wird von der Arginase als abschließendes Enzym des Harnstoffzyklus zu Harnstoff und L-Ornithin metabolisiert, während die NOS L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO[•]) und der nicht-proteinogenen Aminosäure L-Citrullin oxidiert.

Von der Arginase synthetisiertes L-Ornithin ist ein Substrat der Polyaminsynthese, zu denen Putrescin, Spermin und Spermidin gehören. Durch das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC) wird L-Ornithin zum ersten Polyamin, Putrescin, umgesetzt. Die Polyamine sind essentielle Wachstumsfaktoren für die Zelle. Der zweite Weg der Umsetzung von L-Ornithin führt durch die Ornithin-Aminotransferase (OAT) zur L-Prolin-Synthese¹⁷. Die Verfügbarkeit von L-Prolin limitiert die Synthese von Kollagen und damit die Synthese der extrazellulären Matrix¹⁸. Da Kollagen einen Großteil des Trockengewichtes der Dermis ausmacht, ist es für die Homöostase der Dermis von Bedeutung.

Eine erhöhte Arginaseaktivität verschiebt das Proliferations-Differenzierungsgleichgewicht der Zelle somit in Richtung Wachstum und Proliferation. Gleichzeitig wird durch die Metabolisierung des gemeinsamen Substrats die Verfügbarkeit an L-Arginin für die NO[•]-Synthasen limitiert. Aufgrund ihrer Enzymeigenschaften (siehe Kap. 1.3.2.) ist insbesondere die induzierbare NO[•]-Synthase (iNOS)¹⁹ betroffen. Eine Hemmung der Polyaminsynthese und die nachfolgende intrazelluläre Depletion im Gegenzug inhibieren das Zellwachstum²⁰.

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid, NO[•], hat multiple Effekte auf menschliche Zellen.

1987 wurde NO[•] als *Endothelium derived relaxing Factor* charakterisiert²¹, der bedeutendste endogen synthetisierte Vasodilatator.

Niedrige NO[•]-Konzentrationen, wie sie die neuronale NOS (nNOS) und endotheliale NOS (eNOS) streng reguliert synthetisieren, sorgen für einen konstanten Vasotonus. Sie hemmen außerdem die Zytokinausschüttung, die Chemokinsynthese und die Leukozytenadhäsion und vermitteln somit antiinflammatorische Effekte. Eine hohe NO[•]-Freisetzung durch die iNOS zeigt potentielle zytotoxische und proinflammatorische Wirkungen²². Abhängig von der

Einleitung

physiologischen- bzw. pathophysiologischen Situation der menschlichen Haut sind jedoch auch antiapoptotische- und differenzierungsinduzierende Einflüsse beschrieben worden²³.

In menschlichen Keratinozyten vermittelt NO[•] einen biphasischen Effekt. In niedrigen Konzentrationen hat NO[•] eine stark stimulierende Wirkung auf die epidermale Proliferation. In hohen Dosen dagegen induziert es die Zelldifferenzierung und vermittelt antiinflammatorische Reaktionen²⁴.

Für die kutane Homöostase haben die Koexpression und Aktivität des Arginase- und des iNOS-Enzyms wegen der inversen Effekte auf Differenzierung und Proliferation eine entscheidende regulierende Funktion.

1.3.2. Regulation und Bedeutung der durch die iNOS vermittelten NO[•]-Synthese

Die iNOS ist ein im Zytosol lokalisiertes Enzym. Sie ist ein Homodimer, beide Untereinheiten haben jeweils ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa²⁵. Im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen ist die iNOS in ihrer Aktivität Ca²⁺-unabhängig.

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT-1α sind für die Aktivierung des Promotors der iNOS und somit für ihre Transkription essentiell²⁶.

Als Kofaktoren der iNOS werden NADPH, FMN, FAD, und Tetrahydrobiopterin benötigt, Calmodulin und Protoporphyrin IX (Häm) sind fest an das Enzym gebunden^{27,28}. Freigesetztes NO[•] hat multiple Effekte auf die Zellen.

Das freie Radikal vermittelt außer den vasodilatatorischen Effekten zusätzlich wichtige regulatorische Einflüsse auf die Zelle. Neben antimikrobiellen und antiinflammatorischen Aktivitäten kann es je nach physiologischer bzw. pathophysiologischer Situation durch hohe NO[•]-Freisetzung auch zu Gewebeschädigungen und Nekrosen kommen²⁹. Nach Synthese des iNOS-Proteins werden bis zum proteasomalen Abbau des Enzyms, und solange ausreichend Substrat vorhanden ist, kontinuierlich hohe NO[•]-Quantitäten freigesetzt³⁰. Die Halbwertszeit des NO[•]-Radikals beträgt wenige Sekunden.

Die Regulation der iNOS findet hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene statt. Posttranskriptionale Regulation durch Beeinflussung der mRNA-Stabilität, Dimerisierung, Phosphorylierung und Kofaktorbindung wurden ebenfalls gezeigt³¹ und dienen als Kontrollmechanismen. Induziert wird die iNOS vor allem durch Th1-Zytokine und bakterielle Bestandteile wie z.B. Lipopolysaccharide²⁹. Th2-Zytokine verhalten sich invers und hemmen die iNOS-Expression.

1.3.3. Regulation des durch die Arginase medierten L-Arginin-Metabolismus

Die Arginase existiert in zwei Isoformen; Arginase-1 ist im Zytosol lokalisiert und wird insbesondere in der Leber, aber auch in der Haut exprimiert. Die Arginase-2 ist ein mitochondriales Enzym, welches in vielen Geweben und in der Niere exprimiert wird und aktiv ist³².

Die Arginase-1 wird durch Th2-Zytokine wie IL-4/ -10/ -13 und TGF- β induziert.

Th1-Zytokine wie IL-1 β /2, IFN- γ und TNF- α dagegen haben einen hemmenden Effekt auf die Expression der Arginase-1 und die Proteinaktivität³³. Die Regulation der Arginase-1 durch die Th-1- und Th-2-Zytokine verhält sich also umgekehrt zu der Regulation der iNOS.

1.3.4. Koexpression von iNOS und Arginase-1 führt zu einer Substratkonkurrenz

Die iNOS und die Arginase-1 stehen in direkter Substratkonkurrenz miteinander.

Bisher wurde *in vitro* gezeigt, dass der größte Teil des intrazellulären L-Arginins von der Arginase-1 und nur ein kleiner Teil von der iNOS umgesetzt wird³⁴. Zwar ist die Affinität von L-Arginin zur Arginase-1 um den Faktor 1000 niedriger als zur iNOS, die V_{\max} der Arginase-1 ist jedoch ca. 1000-mal höher als die der iNOS (Tab. 1.1.)

Tab. 1.1. Affinität und Maximalgeschwindigkeiten der iNOS und Arginase-1
(Daten von Knowles and Moncada, 1994³⁵; Jenkinson *et al.*, 1996³⁶)

Enzym	Affinität (K_m)	V_{\max} in $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$
Arginase-1	2-20 mM	1400
iNOS	2-20 μM	1

Physiologische L-Arginin-Plasmakonzentrationen beim gesunden erwachsenen Menschen liegen im Bereich von ca. 60-120 μM . Bei einer gewöhnlichen Th-1-dominierten Entzündungsreaktion vermitteln die Th-1-Zytokine eine iNOS-Induktion und eine simultane Hemmung der Arginase-1.

Bei einem gesteigerten L-Arginin-Umsatz eines der beiden Enzyme werden große Mengen des gemeinsamen Substrats L-Arginin verbraucht. Das konkurrierende Enzym kann durch diese Mangelsituation entsprechend weniger Substrat umsetzen.

1.4. L-Arginin-Transport durch die kationischen Aminosäuretransporter (hCAT)

1.4.1. Struktur und Funktion

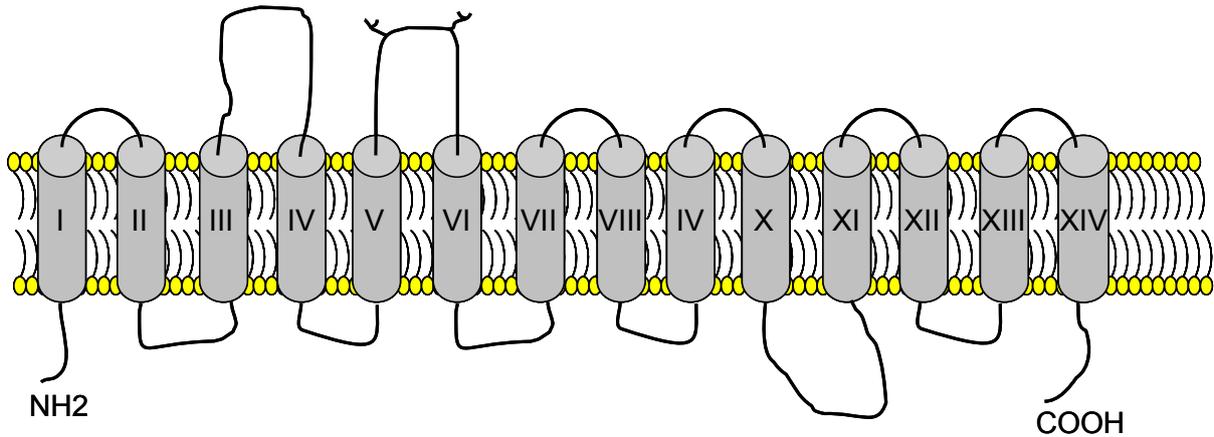
Anfang der 90er Jahre wurden die kationischen Aminosäuretransporter (CAT) erstmals an kultivierten Tierzellen beschrieben^{37,38}. Diese Transportproteine mediierten als Antiporter den Austausch der drei kationischen Aminosäuren, L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin über die Zellmembran.

Die humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCAT) sind membranständige Proteine mit 14 Transmembrandomänen, die durch kurze intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Es handelt sich bei den hCAT um Antiporter, welche die kationischen Aminosäuren über die Zellmembran in die Zelle sowohl hinein, als auch hinaus transportieren³⁹.

Zum Na^+ - und pH-Wert-unabhängigen Transportsystem y^+ gehörend, sind sie sensitiv gegenüber transmembranärer Stimulation⁴⁰. Bei hohen extrazellulären L-Arginin-Konzentrationen kommt es zu einem L-Arginin-Influx bei gleichzeitigem Eflux von L-Lysin und L-Ornithin. Die hCAT sind sensibel gegenüber Veränderungen im Membranpotential^{41,42}. Hyperpolarisation der Zelle ist eine treibende Kraft für den Influx kationischer Aminosäuren. Man unterscheidet die Transporter hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B, hCAT-3 und hCAT-4. hCAT-3 und hCAT-4 werden jedoch nicht in menschlicher Haut exprimiert und werden daher hier nicht weiter beschrieben.

Die Transporter hCAT-2A und hCAT-2B werden durch ein gemeinsames Gen codiert, nach der Transkription jedoch unterschiedlich gespleißt⁴³. Durch das alternative Spleißen entstehen die beiden Isoformen, die sich in einer Folge von 42 Aminosäuren, lokalisiert zwischen der achten und neunten Schleife, unterscheiden.

extrazellulär



intrazellulär

Abb. 1.5. Schematisierte Struktur von hCAT-1 in der Zellmembran (modifizierte Abb. von Verrey *et al.* 2004⁴⁴)

Die schematisierte Struktur von hCAT-1 zeigt das Protein in der Zellmembran.

Es besteht aus 14 Transmembrandomänen, die durch kurze intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Zwischen der Domäne V und VI (dritte extrazelluläre Schleife) ist das Protein glykosyliert.

Trotz dieser verhältnismäßig geringen Variation unterscheiden sich die Transporteigenschaften der beiden Spleißvarianten deutlich voneinander (Tab. 1.2.).

Der Transporter hCAT-1 wird ubiquitär und konstitutiv in vielen Zellarten exprimiert und sorgt für den basalen L-Arginin-Influx zur Versorgung der Arginase-1 und der konstitutiven NOS (cNOS), also der eNOS und nNOS.

Transkripte von hCAT-2A werden in Hepatozyten sowie in glatten Muskelzellen exprimiert. Diese Isoform wird daher auch als „Leber-Typ-hCAT“ bezeichnet. Die Affinität zu L-Arginin ist im Vergleich zu hCAT-1 und hCAT-2B deutlich geringer (hohe K_m), die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) deutlich höher⁴⁵.

Die hCAT-2B-Isoform besitzt ähnliche Transporteigenschaften wie hCAT-1, jedoch mit dem Unterschied, dass hCAT-2B nicht konstitutiv in vielen Gewebearten exprimiert, sondern erst unter inflammatorischen Bedingungen induziert wird. Für beide hCAT-2-Isoformen konnte eine Induktion durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , sowie durch bakterielle Lipopolysaccharide beobachtet werden³⁹.

	Affinität	Spezifität	Regulation
CAT-1	Hoch $K_m = 111-160 \mu\text{M}$	L-Arg L-Lys	L-Arg-Depletion Proinflammatorische Zytokine
CAT-2A	Niedrig $K_m = 3-4 \text{ mM}$	L-Arg; L-Lys; L-Orn	Proinflammatorische Zytokine
CAT-2B	Hoch $K_m = 320-730 \mu\text{M}$	L-Arg	NFkB Glucocorticoide ↓ Proinflammatorische Zytokine

Tab. 1.2. Biochemische Charakteristika und Regulation der hCAT-Isoformen (modifizierte Tab. von Closs *et al.* 1997⁴⁵)

In der Tab. bedeutet ↑ eine leichte, ↑↑ eine starke Induktion der jeweiligen Isoform. Eine Hemmung wird durch ↓ gekennzeichnet.

Der einzige zum System y^+ gehörende Transporter, für den eine Regulation durch die Verfügbarkeit kationischer Aminosäuren nachgewiesen werden konnte, ist hCAT-1⁴⁶.

Eine extrazelluläre Depletion kationischer Aminosäuren führte hier zu einer Hochregulierung von hCAT-1.

1.4.2. Rolle des L-Arginin-Transports durch die hCAT in der Haut

Die hCAT besitzen für die epidermalen Keratinozyten einen zwar indirekten, aber sehr wichtigen und starken Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungshomöostase. Durch die Koexpression beider um das Substrat L-Arginin konkurrierenden Enzyme NOS und Arginase-1 haben die hCAT eine regulatorische Bedeutung für den Zellanabolismus. Schnorr *et al.*⁴⁷ haben gezeigt, dass menschliche Keratinozyten neben hCAT-1 auch hCAT-2 konstitutiv exprimieren. Proinflammatorische Zytokine führten bei diesen Versuchsreihen zu einer Induktion der iNOS und einer parallelen Hochregulation von hCAT-2. Eine Differenzierung zwischen hCAT-2A und hCAT-2B wurde nicht vorgenommen. Das folgende Schema zeigt die intrazelluläre L-Arginin-Utilisation eines gesunden menschlichen Keratinozyten und deren Effekte in physiologischer Stoffwechsellage.

Einleitung

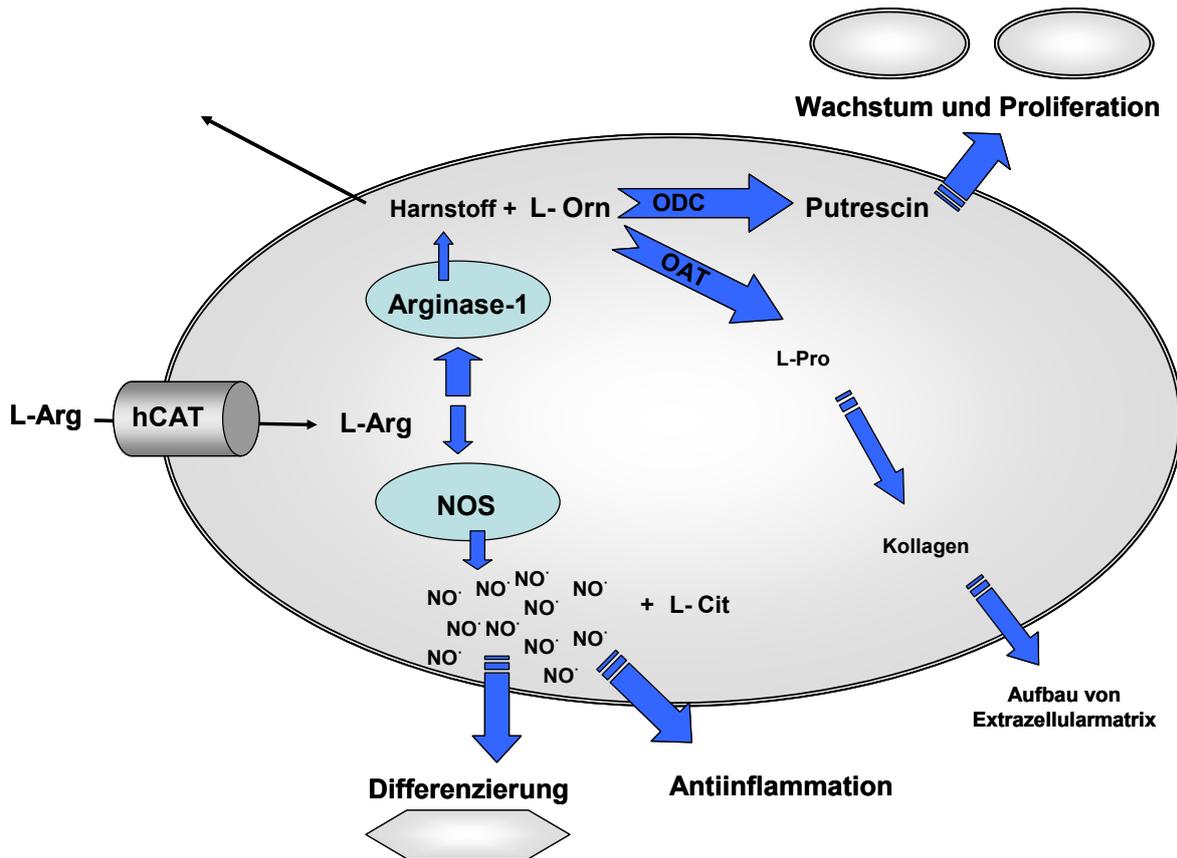


Abb. 1.6. Schematisierter L-Arginin-Stoffwechsel in menschlichen Keratinozyten

Ein großer Teil des durch die hCAT transportierten L-Arginins wird durch die Arginase-1 zu Harnstoff und L-Ornithin metabolisiert. Durch die ODC wird L-Ornithin zu Putrescin umgesetzt, die OAT verstoffwechselt L-Ornithin zu L-Prolin. Als essentielle Aminosäure für Kollagen ist L-Prolin der limitierende Faktor für den Aufbau der extrazellulären Matrix. Putrescin hat als Polyamin einen proliferativen Effekt auf den Keratinozyten. Die NOS metabolisiert L-Arginin zu L-Citrullin und NO[•]. In ausreichenden Quantitäten freigesetztes NO[•] leitet eine Zelldifferenzierung ein und mediiert antiinflammatorische Effekte.

Durch die hCAT wird extrazelluläres L-Arginin in den Keratinozyten transportiert, wo es zum größeren Teil von der Arginase-1, zum geringeren von der NOS verstoffwechselt wird.

Die Arginase-1 synthetisiert Stoffwechselprodukte für den Anabolismus der Zelle, für die Zellteilung und für die Bindegewebssynthese. Das von der NOS freigesetzte NO[•] stimuliert im Gegenzug die Differenzierung der Zelle und zeigt bei physiologischer Zellstoffwechsellage ausreichende antiinflammatorische Wirkungen. In gesunden Keratinozyten ist also ein engmaschig kontrolliertes Gleichgewicht zwischen Proliferations- und Differenzierungsstimuli zu beobachten. Im Rahmen der Pathophysiologie kommt es bei der Wundheilung oder bei Entzündungssituationen zu entsprechenden Induktionen bzw. Hemmungen beider Enzyme (siehe Kap. 1.3.2 und 1.3.3.). Für eine Charakterisierung der Entzündungssituation und Hyperproliferation psoriatischer Keratinozyten ist die Koexpression der NOS und der Arginase-1 von großer pathophysiologischer Relevanz.

Einleitung

Die hCAT sind über den Transport des Substrates beider konkurrierenden Enzyme somit entscheidend an der Regulation von Zellproliferation und Inflammation beteiligt.

1.5. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der mRNA-Expression der hCAT-Isoformen hCAT-1 und hCAT-2 in läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut. Die Expression der hCAT-2-Isoformen hCAT-2A und hCAT-2B wird differenziert voneinander bestimmt werden.

In einer zweiten Versuchsreihe soll mittels Zellkulturversuchen gezeigt werden, welchen Einfluss UV-B-Bestrahlung auf die mRNA-Expression der hCAT sowie auf die Arginase-1-Expression und Arginaseaktivität in primären menschlichen Keratinozyten hat. Diese Versuchsreihe soll Hinweise auf mögliche Auswirkungen der UV-B-Therapie bei psoriatischen Keratinozyten *in vivo* geben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen neue Erkenntnisse über mögliche molekularbiologische Ursachen und Hintergründe epidermaler Hyperproliferation sowie der Entzündungssituation in der Psoriasis liefern.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und sonstige verwendete Materialien

Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf); Bromphenolblau (Merck, Darmstadt);

EDTA: Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (Sigma, Deisenhofen);

Trypsin (Serva, Heidelberg); Tris-Acetat (Merck)

2.1.2. Zytokine und Enzyme

IL-1 β : rekombinantes Interleukin-1 β ; IFN- γ : rekombinantes humanes γ -Interferon; TNF- α : rekombinanter Tumor-Nekrose-Faktor (alle Strathmann Biotec, Hamburg)

2.1.3. Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

FCS: Fetal calf serum (High-Quality) (PAA Laboratories, Linz, Österreich);

KGM-2: Keratinocyte Growth Medium (BioWhittaker, Walkersville USA); Glutamax: (L-Alanyl-Glutamin) 100-fach (PAA); HEPES (GIBCO, Eggerstein); Pen-Strep: Penicillin-Streptomycin (GIBCO)

2.1.4. Gerät, Materialien und Reagenzien für die Real-time-PCR

Für die Real-time-PCR-Messungen in dieser Arbeit wurden folgende Geräte und Produkte verwendet (Tab. 2.2.1.)

Tab. 2.1.1. Real-time-PCR-Gerät und Material

Bezugsquelle	Produkte
Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)	Light Cycler
Roche Diagnostics GmbH	SYBR Green Fast Start DNA Master 1 Kit
Roche Diagnostics GmbH	20 μ l Glaskapillaren

Material und Methoden

Tab. 2.1.2. listet die verwendeten Reagenzien auf. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Primer stammen aus dem Roche-Kit „Fast Start DNA Master SYBR Green 1“.

Tab. 2.1.2. Light Cycler-Reagenzien und Konzentrationen

Reagenzie	Konzentration
Fast Start Enzyme Mix SYBR Green 1	1x
H ₂ O PCR Grade	-
MgCl ₂	25 mM
Primer Sense (Sigma)	5 pmol/μl
Primer Antisense (Sigma)	5 pmol/μl

2.1.5. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Tab. 2.1.3. zeigt die Zusammensetzung des TAE-Puffers, Tabelle 2.1.4. die des Bromphenolblau-Ladepuffers.

Tab. 2.1.3. Zusammensetzung des TAE-Puffers

Reagenzie/Lösung	Konzentration (mM)
Tris Ac (Merck)	40,0
NaCl	10,0
EDTA	1,0

pH 7,8

Tab. 2.1.4. Zusammensetzung des Bromphenolblau-Ladepuffers

Reagenzie/Lösung	Menge
Glyzerin in TA-Puffer	50,0 % (v/v)
EDTA	1,0 mM
Bromphenolblau	2,0 mg/ml

Auf 1000 ml Agaroselösung wurde 1,0 mg Ethidiumbromid gegeben. Als Marker wurde der „DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 base pair ladder“ (0,25 μg/μl) von Roche verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die primären menschlichen Keratinozyten wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Nach Erreichen 75%-iger Konfluenz in der Zellkulturflasche wurden die Zellen nach Zugabe von Trypsin-EDTA (Gibco) 15 Minuten bei 37°C inkubiert und mit einer Pipette mehrfach aufgezogen, um die Zellen zu dissoziieren.

Nach dieser Behandlung wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe eines Trypsin-Inhibitors gestoppt und für 10 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf Zellkulturschalen verteilt.

Für die Untersuchungen zu den Effekten von proinflammatorischen Zytokinen wurden die Zellen für fünf Tage in Abwesenheit von Hydrocortison kultiviert.

2.2.2. Zytokinaktivierung

Zur Untersuchung der Effekte von Zytokinen auf die primären menschlichen Keratinozyten wurde eine Kombination von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (je 1000 U/ μ l) verwendet.

2.2.3. UV-B-Bestrahlung

Für die UV-B-Bestrahlung der primären menschlichen Keratinozyten von 0–20 mJ/cm² wurde eine Lampe des Typs VL-115-M (CTF-Labortechnik, Wasserburg) mit einer Leistung von 15W und einem Emissionsmaximum von 312 nm verwendet.

2.2.4. RNA-Isolierung, RNA-Konzentrationsbestimmung und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolation aus Biopsien gesunder, läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut wurde in der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die Isolation zellulärer RNA aus primären Keratinozyten wurde mittels „Qiagen RNA Isolierung Kit RNeasy“ (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Material und Methoden

Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurde mittels Absorptionsspektrum (A260/A280-Quotient) bestimmt. Verwendetes Gerät war das „Lambda 25 UV/VIS Spectrometer“ (Perkin-Elmer & Co GmbH, Überlingen).

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg der RNA eingesetzt, wobei als Primer ein Oligonukleotid verwendet wurde. Die Reaktion erfolgte bei 37° C für 60 Minuten. Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (Tab. 2.2.1.).

Tab. 2.2.1. Reverse-Transkriptase-Ansätze

Reagenzie	Menge / Probe in µl
10x RT Buffer (Qiagen, Hilden)	2
Omniscript RT (Qiagen)	0,25
RNAse OUT (40U/µl) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)	0,25
5mM d-NTP Mix (Invitrogen)	2
Oligo dT	1
H ₂ O Rnasefrei (Qiagen)	4,5
RNA	1 µg

2.2.5. Prinzip, Pipettierschemata und Protokolle der Real-time-PCR

Um eine quantitative Analyse der Genexpression vornehmen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Real-time-PCR Methode verwendet. Hierbei misst der Laser des in dieser Arbeit verwendeten Cyclers die Fluoreszenzintensität eines Farbstoff-DNA-Komplexes bei einer bestimmten Wellenlänge nach der Amplifikationsphase eines jeden abgeschlossenen Zyklus. Dabei ist die Leuchtintensität proportional zu der synthetisierten DNA-Menge.

Für die Quantifizierung von läsionaler und nicht-läsionaler Haut im Verhältnis zu gesunder Haut, wie auch für die Messungen der Expression der Keratinozyten-mRNA wurde folgendes Pipettierschema verwendet. Die Konzentrationen der entsprechenden Reagenzien finden sich in Kap. 2.1.4.

Tab. 2.2.2. Pipettierschema bei Light Cycler-PCRs

Reagenzie	Menge in μl / Kapillare
cDNA	2
Fast Start Enzyme Mix SYBR Green 1	2
H ₂ O PCR Grade	10,4
MgCl ₂	1,6
Primer Sense	2
Primer Antisense	2

Für die hCAT-1, hCAT-2B und Arginase-1-Messungen der primären Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung und Zytokinaktivierung wurde 1 μl cDNA eingesetzt. Die H₂O-Menge wurde entsprechend um 1 μl auf 11,4 μl erhöht.

Tab. 2.2.3. führt die Protokolle der Real-time-PCR auf. Zur exakten Identifikation der Transkripte werden die zugehörigen *GenBank Accession Nr.* und die Größe des synthetisierten Amplifikats angegeben.

Material und Methoden

Tab. 2.2.3. Light Cycler-PCR-Protokolle, Primer und Accession Nummern

Produkt/ Accession Nr.		Sequenz und PCR Protokoll	Fragment- größe
Humane GAPDH M17851	Sense Antisense PCR-Protokoll	5'- CAACTACATGGTTTACATGTTC-3' (Basen 153-175) 5'- GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3' (Basen 549-568) initiale Denaturierung: 1x (600 s [“] 95°C) Amplifikation: 50x (0 s [”] 95°, 10 s [”] 58°C, 10 s [”] 72°C) Schmelzkurve: 1x (0 s [”] 95°C, 30 s [”] 70°C, 0 s [”] 95°C 0,1°C/s) Abkühlung: 1x (30 s [”] 40°C)	416 bp
Humane CAT-1 NM_003045	Sense Antisense PCR-Protokoll	5'-ATCTGCTTCATCGCCTACTT-3' (Basen 1070-1089) 5'-TAGCAGTCCATCCTCAGCGATG-3' (Basen 1276-1297) initiale Denaturierung: 1x (600 s [“] 95°C) Amplifikation: 50x (0 s [”] 95°C, 10 s [”] 55°C, 20 s [”] 72°C) Schmelzkurve: 1x (0 s [”] 95°C, 30 s [”] 70°C, 0 s [”] 95°C 0,1°C/s) Abkühlung: 1x (30 s [”] 40°C)	228 bp
Humane CAT-2B U76369	Sense Antisense PCR-Protokoll	5'-CCCAATGCCTCGTGTAATCT-3' (Basen 68-87) 5'-TGCCACTGCACCCGATGATAAAGT-3' (Basen 165-188) initiale Denaturierung: 1x (600 s [“] 95°C) Amplifikation: 50x (0 s [”] 95°C, 10 s [”] 55°C, 10 s [”] 72°C) Schmelzkurve: 1x (0 s [”] 95°C, 30 s [”] 70°C, 0 s [”] 95°C 0,1°C/s) Abkühlung: 1x (30 s [”] 40°C)	120 bp
Humane CAT-2A U76368	Sense Antisense PCR-Protokoll	5'-CAAGACGGGGTCTGCATATT -3' (Basen 476-495) 5'-TGCCACATTCCTTTCACAA -3' (Basen 823-843) initiale Denaturierung: 1x (600 s [“] 95°C) Amplifikation: 50x (0 s [”] 95°C, 20 s [”] 58°C, 30 s [”] 72°C) Schmelzkurve: 1x (0 s [”] 95°C, 30 s [”] 70°C, 0 s [”] 95°C 0,1°C/s) Abkühlung: 1x (30 s [”] 40°C)	368 bp
Humane Arginase-1 BC020653	Sense Antisense PCR-Protokoll	5'-GGCTGGTCTGCTTGAGAAAC -3' (Basen 104-123) 5'-ATTGCCAAACTGTGGTCTCC -3' (Basen 298-319) initiale Denaturierung: 1x (600 s [“] 95°C) Amplifikation: 50x (0 s [”] 95°C, 10 s [”] 61°C, 15 s [”] 72°C) Schmelzkurve: 1x (0 s [”] 95°C, 30 s [”] 70°C, 0 s [”] 95°C 0,1°C/s) Abkühlung: 1x (30 s [”] 40°C)	216 bp

Die zehnminütige Phase der initialen Denaturierung dient der kompletten Aufspaltung der DNA-Doppelstränge in Einzelstrang-DNA. Nach der Amplifikationsphase wird eine Schmelzkurve zur Identifikation des PCR-Amplifikats erstellt (siehe Kap. 1.3.1).

Während des Real-time-PCR-Laufes werden initiale Denaturierung, Amplifikation und die abschließende Schmelzkurve fortlaufend protokolliert und am Ende des Laufes folgendermaßen dargestellt.

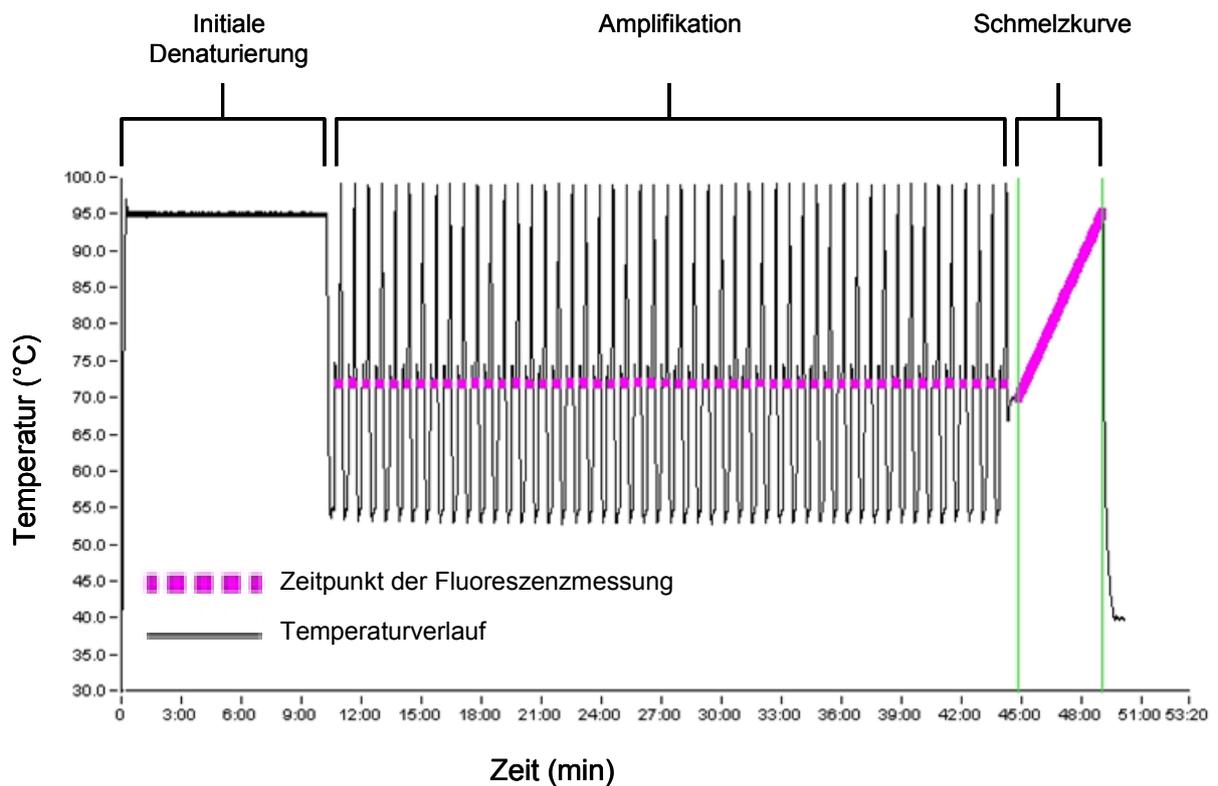


Abb. 2.2.1. Real-time-PCR-Protokoll eines hCAT-2B-Laufes

Nach zehnminütiger initialer Denaturierung folgen 50 identische PCR-Zyklen. Die abschließende Temperatursteigerung dient der Schmelzkurveerstellung (Kap. 2.2.6.1.).

Die Abb. 2.2.1. zeigt die Dauer und die Temperaturverläufe der Phasen der initialen Denaturierung, der Amplifikation und der Schmelzkurveerstellung. Die genaue Protokollierung des PCR-Laufes erlaubt bei etwaiger Fehlersuche nach einer PCR das Ausschließen von Fehlern des Cyclers bzw. der Steuerungssoftware. Außerdem stellt die Fluoreszenzkurve sicher, dass bei wiederholten Läufen gleicher Zielproben identische PCR-Bedingungen herrschen.

2.2.6. Bestimmung und Bedeutung des *Crossing Point* (Cp.)

Der für die Real-time-PCR-Messungen verwendete doppelstrangbindende Farbstoff „SYBR Green 1“ hat, wenn an DNA gebunden, ein Emissionsmaximum bei 521 nm (siehe Light Cycler Manual). Die Messung der Fluoreszenz über den Laser erfolgt nach der Amplifikationsphase eines jeden Zyklus. Abb. 2.2.1. zeigt beispielhaft eine solche Aufzeichnung bei einer hCAT-2B-Real-time-PCR.

Der Cp. ist der Punkt in einer Fluoreszenzintensitätskurve, an dem die gemessene Fluoreszenz über die basale Hintergrundfluoreszenz steigt und damit den Beginn der exponentiellen Phase des PCR-Vorgangs kennzeichnet (siehe Abb. 2.2.2. für das Bsp. hCAT-2B). Ein früher Cp. einer Probe zeigt also eine starke mRNA-Expression des entsprechenden Gens an.

Der Zahlenwert eines erhaltenen Cp. wird zur anschließenden relativen Quantifizierung benötigt und verwendet (siehe Kap. 2.2.7.). Folgende Gleichung beschreibt den Real-time-PCR-Vorgang im Light Cycler:

$$N=N_0 \times E^{Cp.}$$

N: Anzahl der Moleküle zu einem bestimmten Zyklus (Messung nach jeder Amplifikationsphase durch Laser)

N_0 : initiale Molekülzahl

E: Effizienz der Amplifikation (in diesem Fall =2 gesetzt, also Verdopplung der cDNA in jedem Zyklus)

Cp.: Zyklus Nummer der Detektierungsschwelle

Die normalisierten Quotienten der in dieser Arbeit verwendeten Quantifizierungsmethode sind eine Funktion der Effizienz (zur Vereinfachung gleich zwei gesetzt) und der Cps.. Absolute Kopienzahlen werden im vorliegendem Fall nicht bestimmt. Das Prinzip der Auswertung wird in Kap. 2.2.8. erläutert. Folgende Abb. zeigt die Lokalisation eines Cp. in einer Fluoreszenzintensitätskurve.

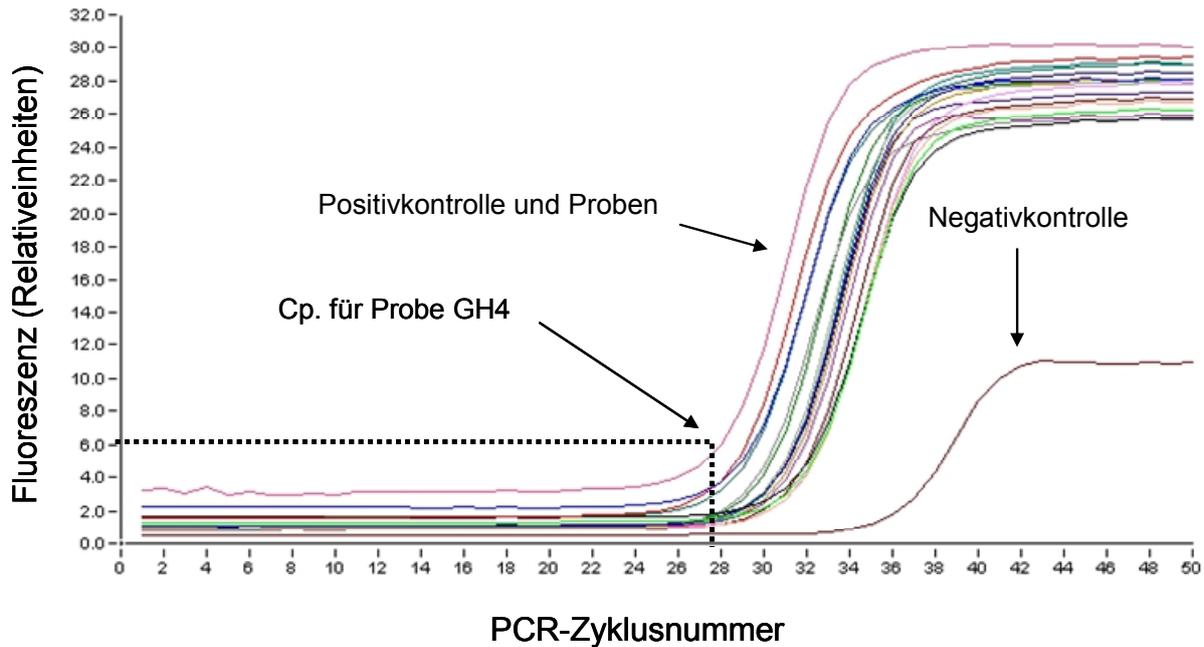


Abb. 2.2.2. Fluoreszenzaufzeichnung während einer hCAT-2B-Real-time-PCR

Die Abszisse zeigt die Nummer des PCR-Zyklus, auf der Ordinate ist die Fluoreszenz in relativen Einheiten angegeben. Der Schnittpunkt der beiden gestrichelten Linien markiert den Cp. der Probe GH4 (gesunde Hautbiopsie 4). Die Primer-Dimer-Bildung der Negativkontrolle zeigt einen deutlich späteren Cp..

Der Cp. für die Probe GH4 (gesunde Hautkontrolle) wurde von der Light Cycler Software bei Zyklus 27,8 berechnet und wird in Abb. 2.2.2. gezeigt.

2.2.7. Identifizierung der Real-time-PCR-Amplifikate

2.2.7.1. Schmelzkurvenanalyse und Schmelzpunktanalyse

Am Ende jedes Laufes wird, wie in den Protokollen angegeben (Abb. 2.2.1.), eine Schmelzkurve erstellt, welche für jedes Amplifikat eine spezifische- und eindeutige Schmelztemperatur zeigen sollte. Der Cycler heizt dazu in konstanten Intervallen von 0,1°C/s von 70°C auf 95°C hoch und misst jede Sekunde die Fluoreszenzintensität. Mit Hilfe der Light Cycler Software wird dabei eine Schmelzkurve erstellt. Je stärker die DNA denaturiert, desto weniger „SYBR Green“ Farbstoff bindet an dem synthetisierten Amplifikat.

Bei zunehmender Denaturierung kommt es zu einem proportionalen Abfall der Fluoreszenz. Der Punkt, an dem der komplette Bruch in DNA-Einzelstränge und somit ein abrupter Fluoreszenzabfall auftritt, ist als Schmelzpunkt definiert. Je mehr Nukleotide das Amplifikat umfasst und je mehr Guanin-Cytosin-Bindungen es besitzt, desto höher ist der entsprechende

Schmelzpunkt. Das Prinzip der Interpretation der Schmelzkurvenanalyse wird in Kap. 3.3.1. an Hand von den Abbn. 3.2. und 3.3. (hCAT-2B) gezeigt.

2.2.7.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifikation der Größe in Basenpaaren (bp) wurden die nach einer Real-time-PCR synthetisierten Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die für die Gele benötigte Menge an Agarose wurde abgewogen, mit der entsprechenden Menge an TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht.

Für die hGAPDH und hCAT-2A wurden 0,8 %-ige Agarosegele verwendet, hCAT-1- und hCAT-2B-Amplifikate wurden auf 1,6 %-igen Gelen aufgetragen.

Insgesamt wurden 8 µl jeder Probe, bestehend aus 5 µl cDNA und 3 µl Ladebuffer, in jede Tasche eingefüllt, sowie 2,5 µl des DNA-Markers.

2.2.7.3. Sequenzierung

Nach Aufreinigung der in der Real-time-PCR synthetisierten Amplifikate mittels des „QIAquick PCR purification Kit“ von Qiagen nach entsprechendem Protokoll wurden die Amplifikate von allen Zielgenen und dem Referenzgen hGAPDH sequenziert.

Die Sequenzierung der entsprechenden Basenfolgen wurde in dem Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt (www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/index.php).

Die Amplifikatsequenzen wurden anschließend mit der Genomdatenbank bei NCBI verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Verwendete Geräte waren der „ABI Prism 3100“ bzw. „ABI Prism 377“ von Applied Biosystems (64293 Darmstadt, Deutschland).

Zur Markierung der Basen wurden „ABI Prism BigDye Terminators“ verwendet.

2.2.8. Quantifizierung der Expressionsunterschiede mittels „RelQuant“

Die Auswertung der am Ende einer Real-time-PCR gewonnenen Daten fand mittels der „RelQuant“ (Version 1.01.) Software von Roche statt. Für die Normierung wurde als Haushaltsgen (Referenz) die hGAPDH verwendet. Das Prinzip der Auswertung stellt sich folgendermaßen dar:

$$\text{Normalisierter Quotient} = \frac{\text{Cp. Zielgen (Probe)}}{\text{Cp. Referenz (Probe)}} : \frac{\text{Cp. Zielgen (Kalibrator)}}{\text{Cp. Referenz (Kalibrator)}}$$

Abb. 2.2.3. Auswertung der Light Cycler-PCRs mittels „RelQuant“

Der normalisierte Quotient wird für jede Probe aus Division der Cps. von Zielgen und Referenz der Probe dividiert durch den Quotienten der Cps. des Zielgens und Referenz des Kalibrators errechnet.

Der Kalibrator ist eine im Lauf gemessene Kontrolle, welche den Wert 1 zugeschrieben bekommt. Alle anderen Proben werden auf diesen Kalibrator bezogen und in ein relatives Mengenverhältnis dazu gesetzt. Es werden also keine absoluten Kopienzahlen bestimmt, sondern relative Verhältnisse errechnet.

2.2.9. Bestimmung der Arginaseaktivität mittels Harnstoffmessung

In Zellkulturüberständen wurde die Harnstoffkonzentration mittels „Urea Nitrogen Assay“ (Sigma) bestimmt. Harnstoff wird durch Urease hydrolysiert, der entstandene Ammoniak reagiert mit Hypochlorit und Phenol in Anwesenheit des Katalysators Nitroprussid zu Indophenol. Die Extinktion des entstandenen Indophenols wurde in einem ELISA-Reader bei 540 nm quantifiziert.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Parameter zu den Biopsien von Psoriasis-Patienten und von gesunden Probanden

Zu den Probanden der ausgewerteten Biopsien wurden in der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf folgende klinische Parameter bestimmt (Tab. 3.1.).

Tab. 3.1. Klinische Parameter der Psoriasis-Patienten und der gesunden Probanden (Selektierte Daten von Schnorr et al. 2005⁴⁸)

	Psoriasis (n = 10)	Kontrolle (n = 10)
Alter (Jahre)	47 ± 12	34 ± 8
PASI	17,4 ± 9	0
C-reaktives Protein (mg/dl)	8,4 ± 4,6	< 0,5

Mit einem PASI von $17,4 \pm 9$ zeigen die Psoriasispatienten eine ausgeprägte klinische Krankheitssymptomatik (siehe Kap. 1.2.). Das C-reaktive Protein als Entzündungsmarker ist im Blut psoriatischer Patienten gegenüber der gesunden Kontrolle deutlich erhöht.

Der Grenzwert des CRP im menschlichen Blut liegt bei $< 0,5$ mg/dl, der bei den gesunden Probanden auch unterschritten wird. Das Alter der Kontrollprobanden liegt mit 34 ± 8 niedriger als das der Psoriatiker mit 47 ± 12 .

3.2. Untersuchungen zur mRNA-Expression kationischer Aminosäuretransporter (hCAT) in psoriatischer Haut

Zur vollständigen Charakterisierung der hCAT-Expression in gesunder und psoriatischer Haut wurde die mRNA-Expression von hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B mittels Real-time-PCR bestimmt. Die Expression des jeweiligen Zielgens sowie der hGAPDH wurde dreimal im Light Cycler® gemessen. Jede Probe (gesunde Haut n = 5, läsionale psoriatische Haut n = 5, nicht-läsionale psoriatische Haut n = 5) des Zielgens wurde auf das Haushaltsgen hGAPDH normiert (siehe Kap. 2.2.8.). Die Abb. 3.1. zeigt die Ergebnisse der Real-time-PCRs.

Ergebnisse

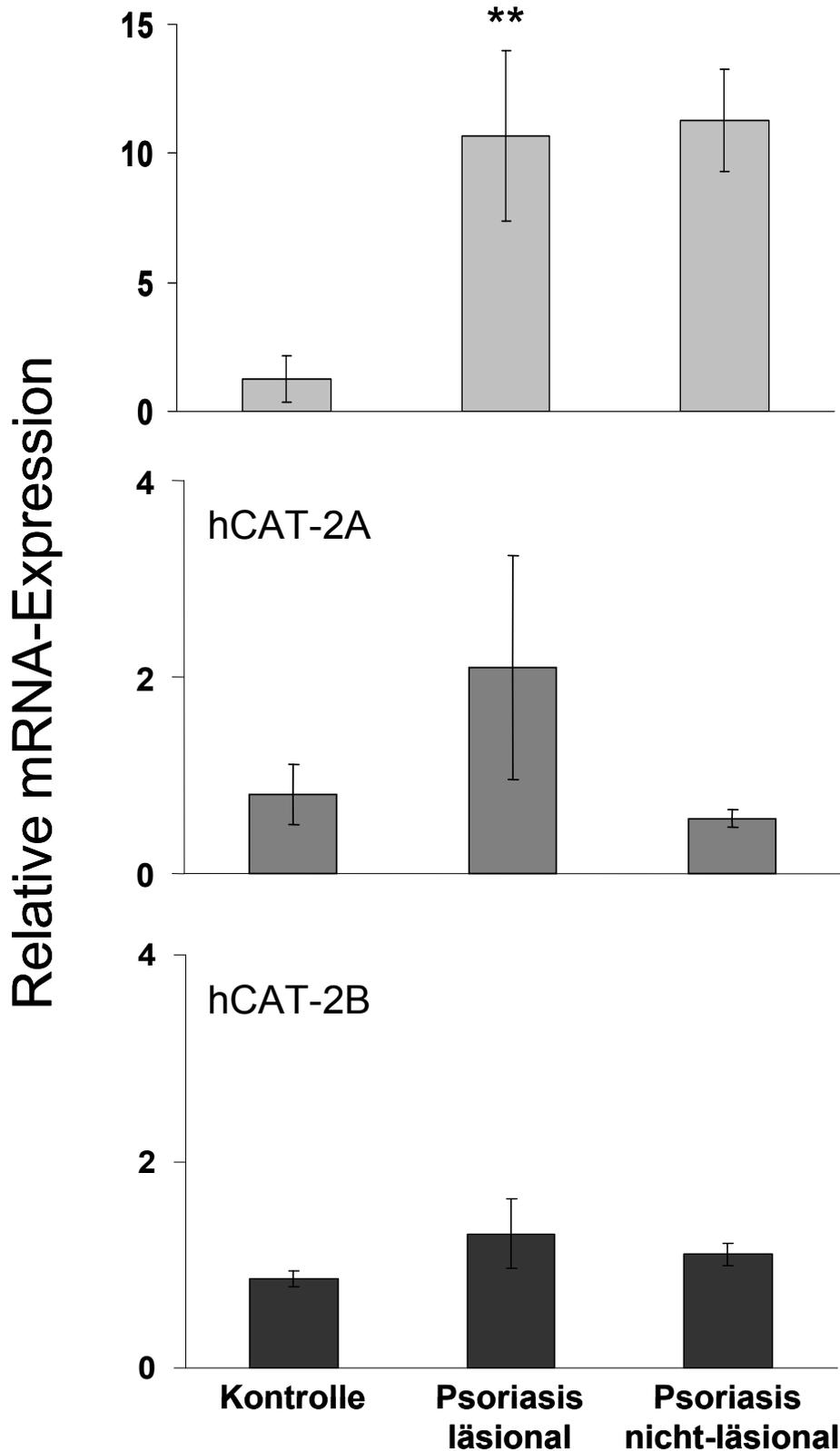


Abb. 3.1. Quantitative mRNA-Expression von hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B in psoriatischer Haut

Die Abb. zeigt die Expression der hCAT-Isoformen hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B in läSIONALER (n = 5) und nicht-läsionaler psoriatischer Haut (n = 5) im Verhältnis zur Kontrolle (gesunde Haut, n = 5).

Die hCAT-1-mRNA ist sowohl in läSIONALER (10,7 ± 3,3 SD), als auch in nicht-läsionaler Haut (11,3 ± 2,0 SD) erhöht. Für die Transporter hCAT-2A und hCAT-2B lassen sich keine Expressionsunterschiede beobachten.

Alle Balken repräsentieren Mittelwerte ± SD. ** P < 0,005.

3.2.1. Deutlich erhöhte hCAT-1-mRNA-Expression

Aufgrund seiner qualitativen und quantitativen Bedeutung für den basalen L-Arginin-Bedarf der Zelle stand die Bestimmung der mRNA-Expression des konstitutiv exprimierten Transporters hCAT-1 im Vordergrund.

Biopsien von sowohl läsionaler als auch nicht-läsionaler psoriatischer Haut zeigen eine hochsignifikante Erhöhung von hCAT-1 auf mRNA-Ebene um mehr als das Zehnfache.

Signifikante Unterschiede der hCAT-1-mRNA-Expression zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut untereinander lassen sich nicht beobachten.

3.2.2. Der „Leber-Typ“ hCAT-2A wird sowohl in gesunder als auch in psoriatischer Haut exprimiert.

Im Anschluss an hCAT-1 wurde die mRNA-Expression des für L-Arginin wenig affinen und wenig spezifischen, aber hochkapazitären Transporters hCAT-2A bestimmt.

Gentranskripte von der „Leber-Typ“-Isoform hCAT-2A konnten sowohl in gesunder, als auch in psoriatischer Haut nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass hCAT-2A überhaupt in der Haut exprimiert wird, ist überraschend. In der Real-time-PCR synthetisierte hCAT-2A-Amplifikate wurden sequenziert (Kap. 2.2.6.3.) und ergaben 100 %-ige Sequenzhomologie bei einem Sequenzvergleich gegen die vollständige Genomdatenbank bei NCBI (Ergebnisse nicht gezeigt). Läsionale Biopsien zeigen eine nichtsignifikant erhöhte Expression der hCAT-2A-mRNA gegenüber der Kontrolle und nicht läsionaler Haut.

3.2.3. Keine hCAT-2B-mRNA-Induktion in psoriatischer Haut

Nach der Bestimmung der mRNA-Expression der hCAT-Isoformen hCAT-1 und hCAT-2A wurde die induzierbare hCAT-2-Spleißvariante hCAT-2B quantifiziert.

Die Isoform hCAT-2B zeigt weder mRNA-Expressionsunterschiede von läsionaler, noch von nicht-läsionaler Haut im Vergleich zur Kontrolle. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied der hCAT-2B mRNA-Expression zwischen läsionaler und nicht läsionaler Haut untereinander beobachten.

3.3. Kontrolle der PCR-Amplifikate am Beispiel von hCAT-2B

Am Beispiel eines hCAT-2B-PCR-Amplifikats wird gezeigt, wie alle Amplifikate der in Real-time-PCR-Läufe untersuchten Proben eindeutig identifiziert wurden. Zur Kontrolle wurden folgende Schritte durchgeführt (3.3.1, 3.3.2. und 3.3.3.).

3.3.1. Spezifisches Amplifikat in Schmelzkurven- und Schmelzpunktanalyse

Am Ende jeder Real-time-PCR wurde vom Light Cycler® nach den Bedingungen des entsprechenden PCR-Protokolls (Tab. 2.2.3.) eine Schmelzkurve erstellt, welche für das synthetisierte Amplifikat eine spezifische Schmelztemperatur zeigt.

Die Schmelzkurven der zu untersuchenden Biopsien zeigen nach der Amplifikation des Zielgens den gleichen Verlauf wie die Kurve der Positivkontrolle.

Für die Negativkontrollen wird zwar auch einen Schmelzpunkt ermittelt; dieser liegt jedoch deutlich niedriger als der von den synthetisierten Amplifikaten und kommt durch das Aufschmelzen von Primer-Dimeren zu Stande. Abb. 3.2. zeigt exemplarisch die Schmelzkurve einer hCAT-2B-Real-time-PCR.

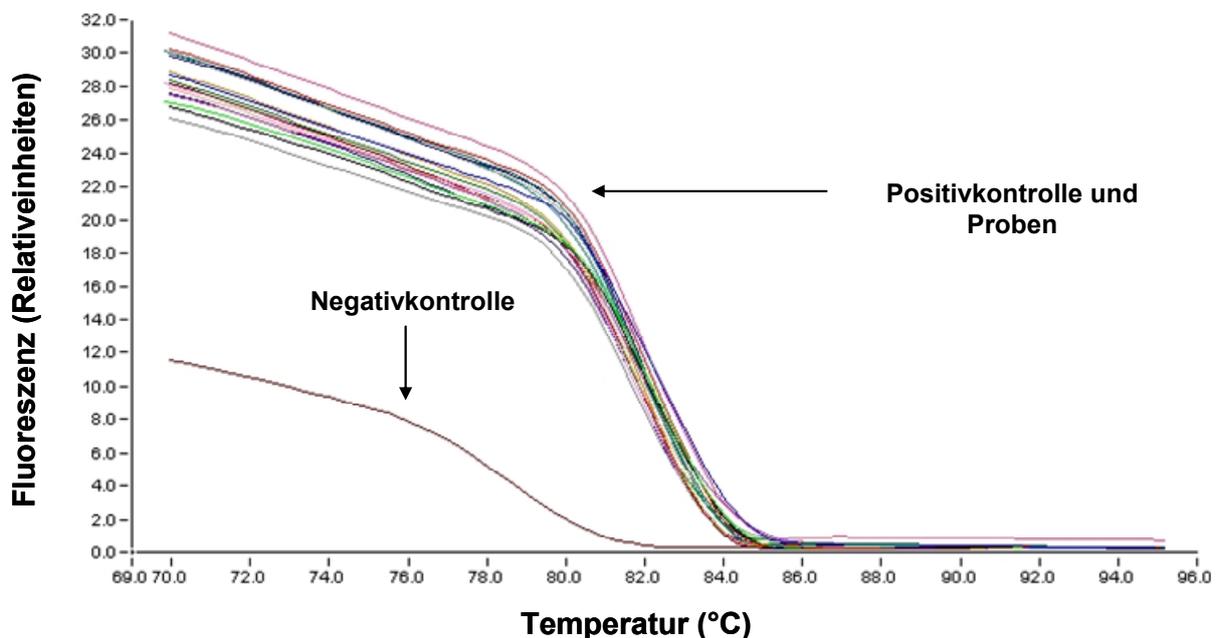


Abb. 3.2. Schmelzkurvenanalyse eines PCR-Amplifikats am Beispiel von hCAT-2B

Das Diagramm zeigt die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur (°C).

Für die Positivkontrolle und alle untersuchten Proben zeigt sich ein maximaler Abfall der Fluoreszenz bei deutlich höherer Temperatur (ca. 82°C) als für die Negativkontrolle (ca. 76°C).

Ergebnisse

Die Positivkontrolle und alle untersuchten Proben weisen einen eindeutigen Abfall der Fluoreszenz ab ca. 80°C auf, welcher bei ca. 82°C sein „Steilheitsmaximum“ hat.

Die Kurve der Negativkontrolle verläuft deutlich anders. Die Abb. 3.3. zeigt die exakten Schmelzpunkte zur Identifikation des Amplifikats, welche sich aus der Schmelzkurve ergeben und errechnet werden.

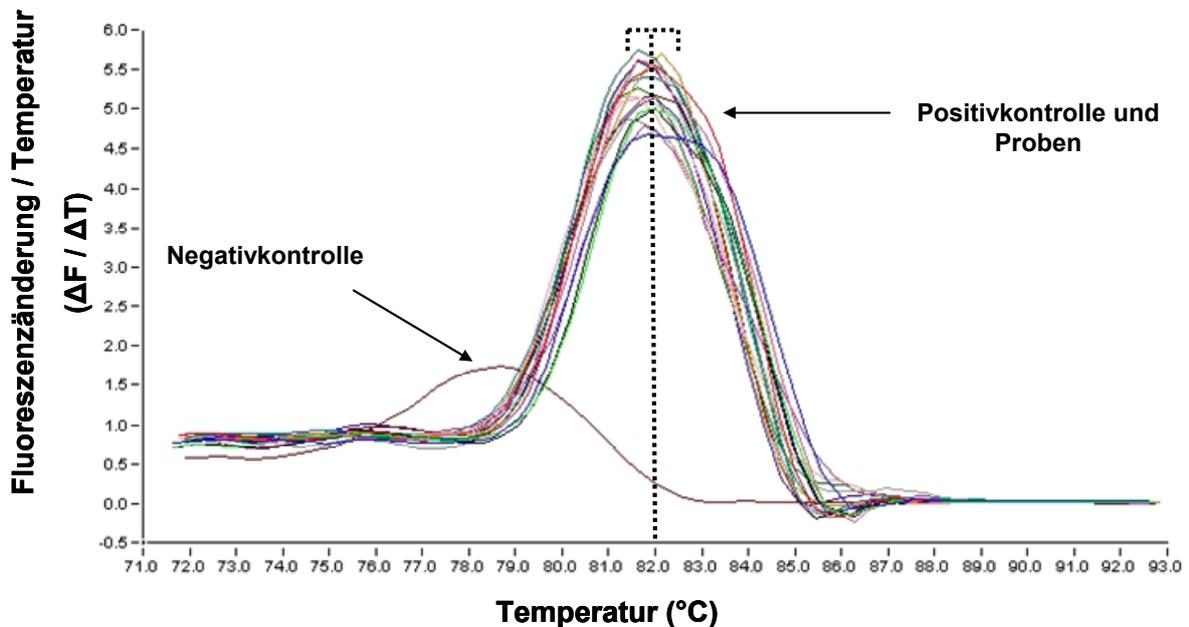


Abb. 3.3. Schmelzpunktanalyse eines PCR-Amplifikats am Beispiel von hCAT-2B

Die Positivkontrolle und die Proben zeigen die stärkste Fluoreszenzänderung / Temperatur bei einer Temperatur von 82°C (Bereich der gestrichelten Linie), während die Negativkontrolle ihr Maximum bei ca. 78,5°C hat.

Die Positivkontrolle sowie alle untersuchten Proben zeigen einen eindeutigen Schmelzpunkt bei ca. 82°C (vgl. mit Abb. 3.2.). Unspezifische PCR-Amplifikate sind während der Amplifikatsynthese nicht entstanden, da keine weiteren Schmelzpunkte zu sehen sind.

Der Schmelzpunkt der Negativkontrolle liegt bei ca. 78,5°C, welcher in späten Phasen der Amplifikation höchstwahrscheinlich durch eine Primer-Dimer-Bildung zu Stande kommt.

3.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Größe der PCR-Amplifikate wurden alle PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Ergebnisse

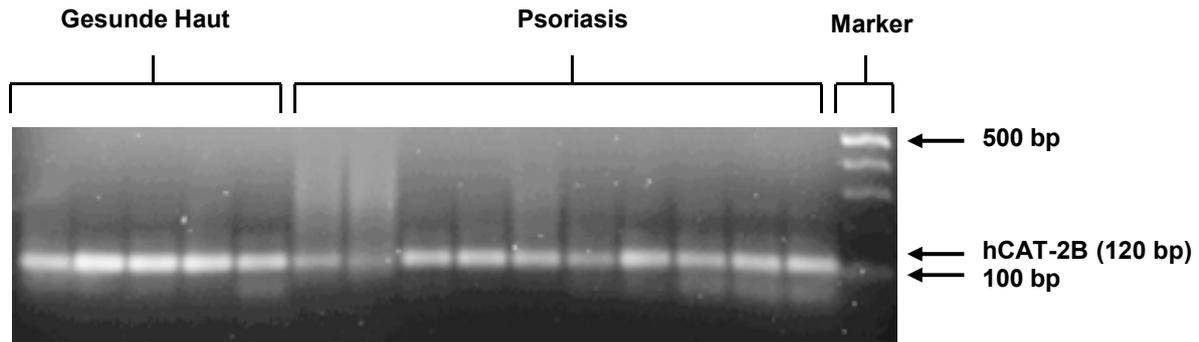


Abb. 3.4. Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate einer Real-time-PCR für hCAT-2B

Die Länge des hCAT-2B Amplifikats beträgt 120 bp und lässt sich für alle auf das Gel aufgetragenen Proben oberhalb der 100 bp Bande des DNA-Markers erkennen.

Die Gelelektrophorese der Proben einer hCAT-2B-Real-time-PCR zeigt das hCAT-2B-Amplifikat, welches in jeder Probe mit einer Größe von 120 bp (siehe Tab. 2.2.3.) kurz oberhalb der 100 bp Bande des DNA-Markers detektiert werden konnte. Die großen Fluoreszenzintensitätsunterschiede und die im Verhältnis zum DNA-Marker sehr starken Banden kommen durch übermäßige Amplifikatsynthesen (außerhalb des linearen Bereichs der PCR) und das abschließende Erstellen der Schmelzkurve zu Stande.

3.3.3. Sequenzierung

Zur weiteren Kontrolle der Sequenz wurden die Basenfolgen der PCR-Amplifikate der Kontrolle, läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut, sowie der Positivkontrolle, durch das BMFZ (siehe Kap. 2.2.7.3.) sequenziert. Abb. 3.5. zeigt ein Teilergebnis einer hCAT-2B-Sequenzanalyse.

Ergebnisse

[gi|2252787|gb|U76369.1|HSU76369](#) Human cationic amino acid transporter-2B (ATRC2)

mRNA, partial cds

Length = 400

Score = 123 bits (62), Expect = 4e-26

Identities = 66/68 (97%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 31  gtctagctcaaatacaattccnaaacgaagacaccaataattgctactttatcatcggng 90
          |||
Sbjct: 121  gtctagctcaaatacaattccnaaacgaagacaccaataattgctactttatcatcgggtg 180
```

```
Query: 91  cagtggca 98
          |||
Sbjct: 181  cagtggca 188
```

Abb. 3.5. Sequenzierung eines PCR-Amplifikats für hCAT-2B zeigt Sequenzhomologie zu hCAT-2B

Der hCAT-2B Sequenzvergleich zwischen PCR-Amplifikat und der Genbank zeigt eine eindeutige Identifikation des Amplifikats als hCAT-2B.

Die Homologie (Identities) zwischen der Sequenz des Amplifikats (Query) und der Sequenz von der Datenbank (Sbjct) beträgt 97 %.

Das Ergebnis des Sequenzvergleiches einer der Proben der hCAT-2B-PCR verifiziert das Amplifikat eindeutig als hCAT-2B. Die nur 97 %-ige Homologie zwischen der Sequenz des synthetisierten Amplifikats und der Sequenz von der Datenbank kommt durch nicht sequenzierte einzelne Basen während der Sequenzierungsprozedur zu Stande (mit n gekennzeichnete Basen der Query).

3.4. Die in psoriatischer Haut am stärksten exprimierte hCAT-Isoform ist hCAT-1.

Für den L-Arginin-Transport in psoriatischer Haut durch die hCAT sind nicht nur die relativen Verhältnisse zur gesunden Haut von Bedeutung, sondern auch die Expressionsebene (absolute Kopienzahl). Um einen Eindruck über die Expressionsebene der hCAT-Isoformen zu bekommen, wurden die Mittelwerte der Cps. der Zielgene der Psoriasis-Proben und gesunden Hautproben bestimmt. Die Bedeutung und Interpretation der Cps. wurde in Kap. 2.2.6. erläutert.

Tab. 3.2. zeigt die Expressionsverhältnisse der Isoformen hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B in psoriatischer Haut und in der Kontrolle. Da bei keinem der untersuchten Gene signifikante Unterschiede von läsionaler und nicht-läsionaler Haut zu beobachten waren (Abb. 3.1), wurde hier läsionale- und nicht-läsionale Haut zusammen betrachtet und dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 3.2. Durchschnittliche Cps. psoriatischer und gesunder Haut für hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B

GEN	Gesunde Haut	Läsionale und nicht-läsionale psor. Haut
hCAT-1	30,5 ± 0,96	27,8 ± 0,91
hCAT-2A	32,5 ± 1,55	32,7 ± 1,36
hCAT-2B	29,3 ± 1,3	29,7 ± 0,98

Das hCAT-1 Gen ist in psoriatischer Haut deutlich stärker exprimiert als beide hCAT-2-Isoformen. Der durchschnittliche Cp. von hCAT-1 liegt fast exakt zwei Zyklen früher als der für das hCAT-2B-Gen. Bei einer gleich zwei gesetzten Effizienz (exakte Verdoppelung der Amplifikate in jedem Zyklus) der Real-time-PCR in allen Läufen bedeutet dies, dass ca. viermal mehr hCAT-1- als hCAT-2B-mRNA-Transkripte in psoriatischer Haut vorliegen.

Der induzierbare Transporter hCAT-2B wird in gesunder Haut mit einem durchschnittlichen Cp. von $29,3 \pm 1,3$ ca. doppelt so stark exprimiert wie der konstitutive hCAT-1 mit einem Cp. von $30,5 \pm 0,96$.

Mit einem durchschnittlichen Cp. von $32,5 \pm 1,55$ für gesunde und $32,7 \pm 1,36$ für psoriatische Haut wird das hCAT-2A-Gen deutlich weniger exprimiert als die anderen untersuchten Transporter.

3.5. Untersuchungen zum Einfluss von UV-B-Licht auf den L-Arginin-Metabolismus menschlicher Keratinozyten

Um Hinweise auf die molekularen Effekte der Psoriasis UV-B-Therapie *in vivo* zu bekommen, wurden primäre menschliche Keratinozyten *in vitro* mit UV-B-Licht-Dosen von 0, 5, 10, und 20 mJ/cm² bestrahlt (Kap. 2.2.3). Die Bestrahlung mit den aufgeführten Dosen zeigte keine zytotoxischen Effekte auf die Keratinozyten.

Die Pathophysiologie entzündeter läsionaler psoriatischer Haut wurde mittels zytokinaktivierten Keratinozyten (Kap. 2.2.2.) simuliert. 24 h nach Aktivierung wurden die Zellen lysiert, mRNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben.

Als *in vitro*-Modell für nicht-läsionale Haut dienten residente primäre Keratinozyten der identischen Zelllinie.

Jedes Zielgen wurde für zwei parallel angesetzte und identische behandelte Keratinozyten-Zellreihen im Cycloer zweimal gemessen und auf eine hGAPDH normiert.

Die Auswertung fand wie in Kap. 3.2. beschrieben statt.

Ergebnisse

Die berechneten und gezeigten Signifikanzen beziehen sich in jeder Abb. auf die residenten und unbestrahlten Keratinozyten. Die Enzymaktivität der Arginase wurde 48 h nach Aktivierung mittels eines Harnstoffessays über die synthetisierten Harnstoffkonzentrationen bestimmt (siehe Kap. 2.2.8.).

3.5.1. Induktion der hCAT-2B-mRNA-Expression in Keratinozyten nach Zytokinaktivierung und UV-B-Bestrahlung

Als hochkapazitärer- und induzierbarer Transporter wurde zu Beginn der Versuchsreihen die Expression der hCAT-2B-mRNA bestimmt.

Die Ergebnisse der mRNA-Expression von hCAT-2B in residenten und aktivierten Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung sind in Abb. 3.6. dargestellt.

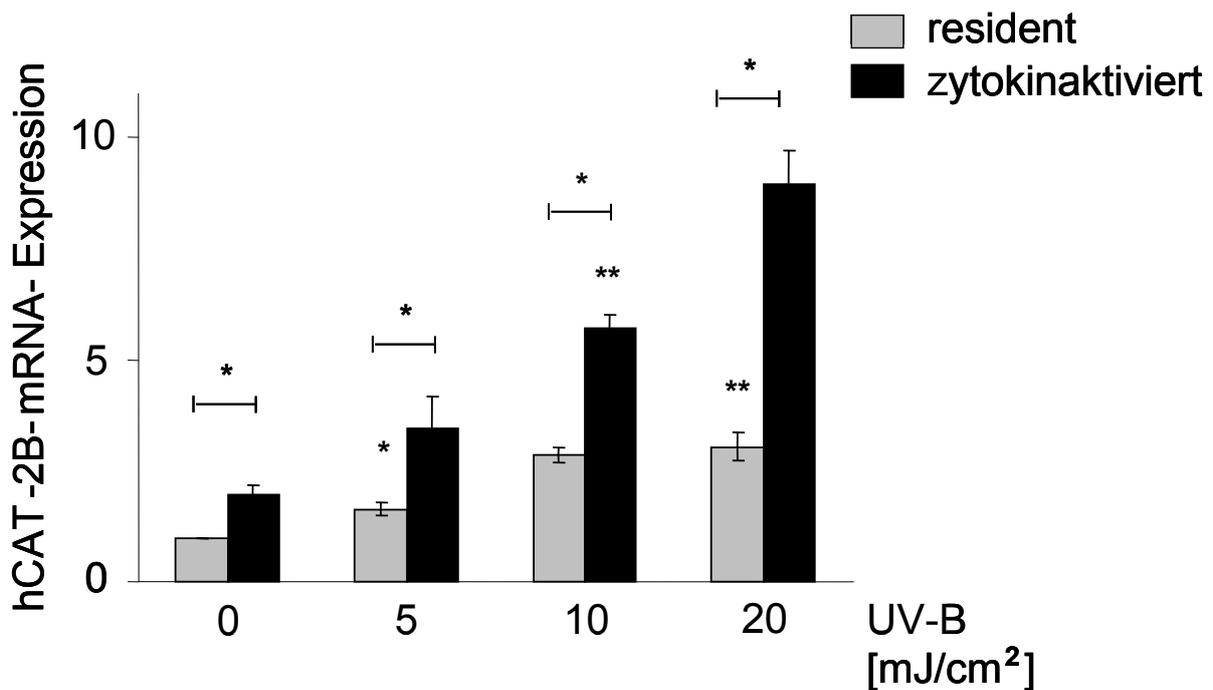


Abb. 3.6. Induktion von hCAT-2B-mRNA in Keratinozyten durch Zytokinaktivierung und UV-B

Alle zytokinaktivierten Zellen ($n = 3$) zeigen eine erhöhte hCAT-2B-mRNA-Expression verglichen mit residenten Keratinozyten ($n = 3$). Residente Zellen zeigen dosisabhängig bei 10 mJ/cm^2 ($2,86 \pm 0,51$) eine signifikante, bei 20 mJ/cm^2 ($3,06 \pm 0,92$) eine hochsignifikante Induktion gegenüber der unbestrahlten residenten Probe. Für aktivierte Keratinozyten lässt sich bei 0 mJ/cm^2 ($1,97 \pm 0,63$) und bei 5 mJ/cm^2 ($3,46 \pm 2,0$) eine signifikante Induktion gegenüber unbestrahlten residenten Zellen beobachten, für 10 mJ/cm^2 ($5,71 \pm 0,89$) und 20 mJ/cm^2 ($8,95 \pm 2,15$) eine hochsignifikante. Alle Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SD.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Durch die Bestrahlung mit UV-B wird die hCAT-2B-mRNA-Transkription sowohl in residenten, wie auch in aktivierten primären Keratinozyten bereits ab 5 mJ/cm^2 dosisabhängig

heraufgeregelt. Eine alleinige Aktivierung der Keratinozyten vermittelt eine ca. zweifache Hochregulation in aktivierten Zellen gegenüber residenten Zellen. Bei 10 mJ/cm² für aktivierte und 20 mJ/cm² für residente Zellen zeigen sich hochsignifikante Induktionen der hCAT-2B-mRNA-Expression.

Dosisabhängig steigt die mRNA-Expression in aktivierten Zellen bei 20 mJ/cm² auf das ca. Neunfache und in residenten Keratinozyten ungefähr um den Faktor drei an. Alle aktivierten und bestrahlten Proben zeigen eine signifikant höhere hCAT-2B-mRNA-Expression als die jeweiligen residenten bei gleicher Bestrahlungsintensität.

3.5.2. Die hCAT-1-mRNA-Expression wird durch UV-B gehemmt.

Im Anschluss an die Bestimmung der Auswirkungen von UV-B und proinflammatorischen Zytokinen auf die hCAT-2B-mRNA-Expression wurden die Effekte dieser Behandlung auf den konstitutiv exprimierten Transporter hCAT-1 untersucht.

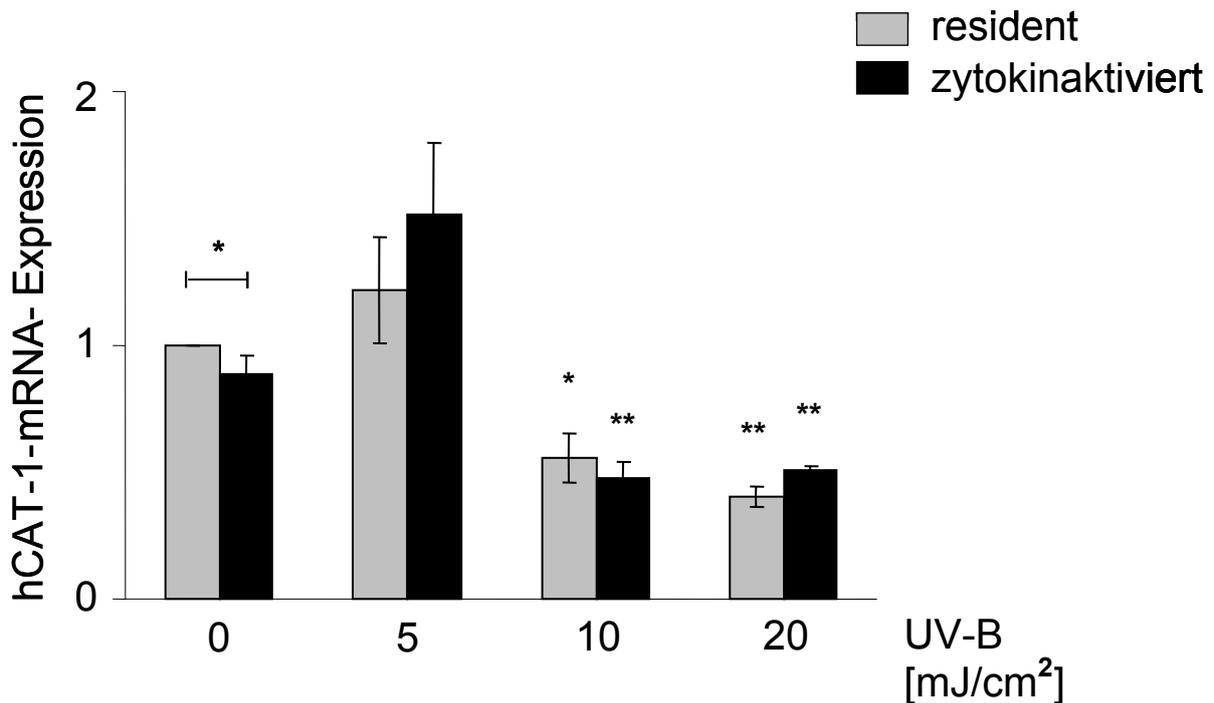


Abb. 3.7. Expressionshemmung von hCAT-1-mRNA in Keratinozyten durch höhere UV-B-Dosen

Die Expression der hCAT-1-mRNA wird in residenten Keratinozyten (n = 3) bei 10 mJ/cm² (0,56 ± 0,27) signifikant und ab 20 mJ/cm² (0,41 ± 0,11) hochsignifikant gegenüber unbestrahlten residenten Keratinozyten gehemmt. Aktivierte Zellen (n = 3) zeigen ab 10 mJ/cm² (0,47 ± 0,2) eine hochsignifikante Hemmung. Nur bei unbestrahlten aktivierten Keratinozyten ist die hCAT-1-mRNA-Expression signifikant niedriger als bei residenten Zellen. Alle Balken repräsentieren Mittelwerte ± SD. * P < 0,05, ** P < 0,01.

Ergebnisse

UV-B-Bestrahlung führt ab 10 mJ/cm^2 zu einem signifikanten Abfall der hCAT-1-mRNA um ca. 50 % gegenüber unbestrahlten Keratinozyten. Bei aktivierten Zellen lässt sich ab 10 mJ/cm^2 und bei residenten Zellen bei 20 mJ/cm^2 eine hochsignifikant erniedrigte hCAT-1-mRNA-Expression von mehr als 50 % beobachten. Eindeutige Unterschiede zwischen residenten und aktivierten Zellen lassen sich bis auf die unbestrahlten Keratinozyten nicht beobachten. Die Bestrahlung mit 5 mJ/cm^2 löst bei aktivierten Keratinozyten eine geringfügige nichtsignifikante Hochregulation der hCAT-1-mRNA aus.

Nach der Bestimmung der mRNA-Expression von hCAT-2B und hCAT-1 wurde auf Real-Time-PCR-Messungen des hCAT-2A-Gens aufgrund der wahrscheinlich geringen Expression in menschlicher Haut (siehe Kap.3.4.) verzichtet.

3.5.3. UV-B und Zytokinaktivierung hemmen die Expression der Arginase-1 und die Arginaseaktivität.

Nach den Messungen der mRNA-Expression der L-Arginin-Transporter hCAT-1 und hCAT-2B wurde nachfolgend die Arginase als L-Arginin verbrauchendes Enzym untersucht. Die Abb. 3.8 zeigt die Ergebnisse der Arginase-1-mRNA-Expression nach UV-B-Bestrahlung und Zytokinaktivierung.

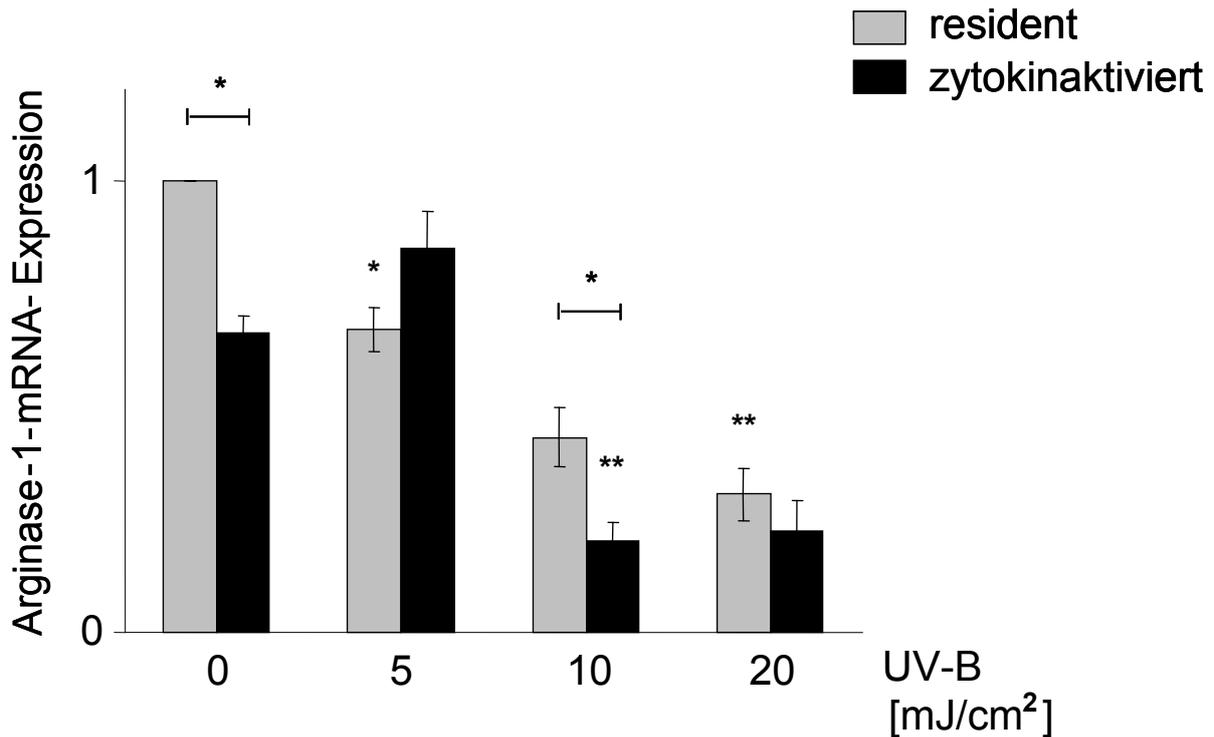


Abb. 3.8. Hemmung der Arginase-1-mRNA-Expression in Keratinozyten durch Aktivierung und UV-B (Die Abb. wurde freundlicherweise von Dr. O. Schnorr bereitgestellt)

Unbestrahlte zytokinaktivierete Zellen ($0,66 \pm 0,04$) zeigen eine signifikant niedrigere Arginase-1-mRNA-Expression gegenüber den residenten Proben. Ab 10 mJ/cm^2 ($0,20 \pm 0,04$) wird die Arginase-1-Expression in aktivierten Zellen ($n = 3$) hochsignifikant gehemmt. Bei residenten Zellen ($n = 3$) zeigt sich dosisabhängig für 5 mJ/cm^2 ($0,67 \pm 0,05$) eine signifikante und ab 20 mJ/cm^2 ($0,31 \pm 0,06$) eine hochsignifikante Hemmung. Alle Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Die Zytokinaktivierung der Keratinozyten führt zu einem deutlichen Abfall der Arginase-1-mRNA-Expression in unbestrahlten Zellen. Nach UV-B-Bestrahlung kann ein Abfall der Arginase-1-Expression beobachtet werden. Residente Keratinozyten zeigen eine von 0 bis 20 mJ/cm^2 dosisabhängige Hemmung der Expression. Für aktivierte Zellen lässt sich eine deutliche Hemmung bei 0, 10 und 20 mJ/cm^2 beobachten.

Die Bestrahlung mit 5 mJ/cm^2 führt bei aktivierten Zellen zu einer nichtsignifikanten Induktion der Arginase-1-mRNA gegenüber den unbestrahlten aktivierten Zellen.

Um den L-Arginin-Metabolismus weitergehend zu charakterisieren, wurde nach der mRNA-Expression die Aktivität des Arginase-Proteins (Abb. 3.9.) bestimmt. Die Ergebnisse des „Urea Nitrogen Assay“ (Methodik siehe Kap. 2.2.9.) weisen das Produkt Harnstoff nach und unterscheiden somit nicht zwischen Arginase-1 und Arginase-2.

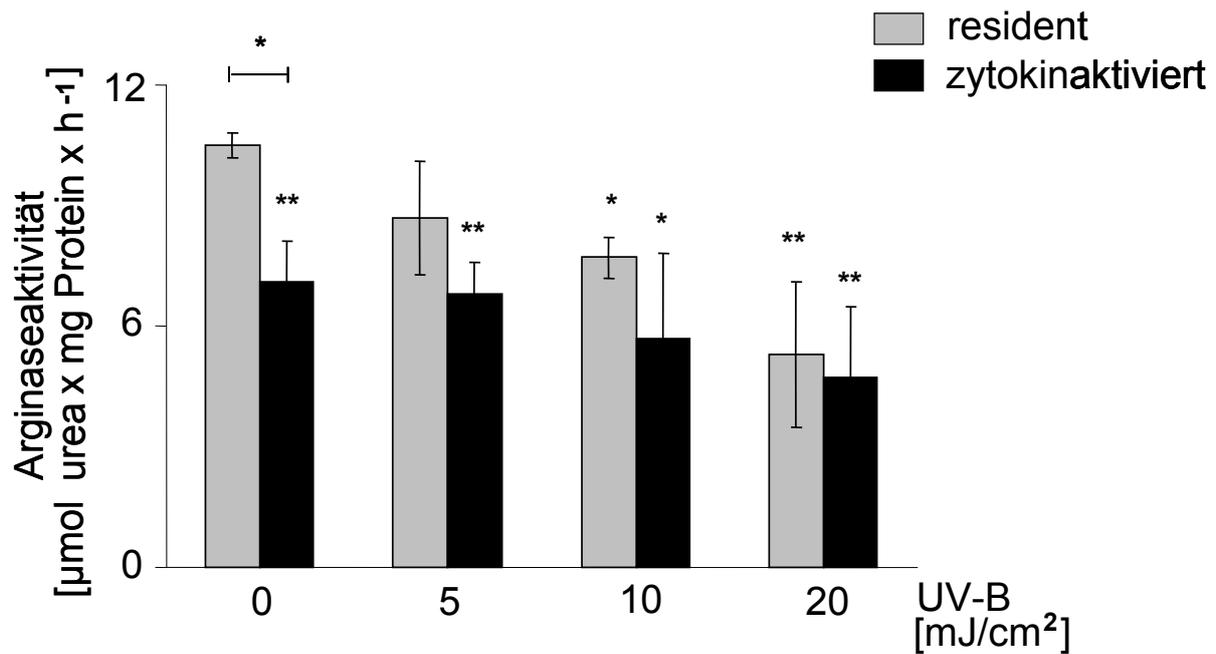


Abb. 3.9. Abnahme der Arginaseaktivität in Keratinozyten durch Aktivierung und UV-B (Die Abb. wurde freundlicherweise von Dr. O. Schnorr bereitgestellt)

Durch eine Zytokinaktivierung wird die Arginaseaktivität bei unbestrahlten Zellen ($7,07 \pm 1,01$) gegenüber residenten unbestrahlten Zellen deutlich gehemmt. Dosisabhängig kommt es durch UV-B bei residenten Zellen ($n = 3$) zu einer Hemmung der Enzymaktivität, die ab 10 mJ/cm^2 ($7,76 \pm 0,53$) signifikant und bei 20 mJ/cm^2 ($5,28 \pm 1,86$) hochsignifikant ausfällt. Alle aktivierten Zellen ($n = 3$) zeigen eine deutlich niedrigere Aktivität als die unbestrahlte residente Probe. UV-B-Licht hemmt die Arginaseaktivität aktivierter Keratinozyten nur geringfügig. Alle Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Die Aktivität der Arginase wird durch UV-B-Licht sowohl bei residenten, als auch bei zytokinaktivierten primären Keratinozyten dosisabhängig gehemmt.

Bei aktivierten Keratinozyten ist die Aktivität von Beginn an signifikant niedriger als bei residenten Zellen. Bis auf die unbestrahlten Zellen lässt sich keine deutliche Abnahme der Arginaseaktivität aktivierter Keratinozyten gegenüber den jeweiligen residenten beobachten. Die UV-B-Bestrahlung aktivierter Keratinozyten zeigt gegenüber den bestrahlten residenten Zellen bei relativ großen SDs einen deutlich geringeren hemmenden Effekt auf die Arginaseaktivität.

4. Diskussion

4.1. Bedeutung der hCAT-Expression für die Substratkonkurrenz von iNOS und Arginase-1 in der Psoriasis

Für das Proliferations- und Differenzierungsgleichgewicht von Keratinozyten ist der L-Arginin-Metabolismus (siehe Kap. 1.4.2.) von großer Bedeutung. Über den Transport von L-Arginin, dem Substrat der konkurrierenden Enzyme iNOS und Arginase-1, greifen die hCAT-Isoformen entscheidend in diese Proliferationshomöostase ein.

Die in Kap. 3 gezeigten Ergebnisse der relativen Quantifizierung von hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B werden im folgenden Kapitel auf ihre Bedeutung hin untersucht und diskutiert.

Relative Quantifizierung bedeutet im vorliegenden Fall, dass keine absoluten Kopienzahlen der PCR-Amplifikate angegeben werden, sondern relative Verhältnisse von den Zielproben zur Referenz (gesunde Haut) erstellt werden. Auf die technisch und methodisch aufwändige Bestimmung absoluter Kopienzahlen wurde verzichtet, da relative Verhältnisse von psoriatischer Haut zur Kontrolle für die Diskussion der pathophysiologischen Bedeutung der hCAT-Isoformen ausreichend sind.

Läsionale psoriatische Haut zeigt eine Überexpression der Arginase-1 bei gleichzeitiger Koexpression der iNOS⁴⁹. Die iNOS wird zwar in psoriatischer Haut exprimiert, ist aber wahrscheinlich in ihrer Aktivität durch die L-Arginin-verbrauchende Arginase limitiert.

Die freigesetzten NO⁻-Mengen sind zu gering, um einen antiproliferativen und antiinflammatorischen Effekt zu entfalten. Diese niedrigen NO⁻-Konzentrationen stimulieren sogar bewiesenermaßen das epidermale Wachstum⁵⁰. Zusätzlich steigen durch die erhöhte Arginaseaktivität die intrazellulären Spiegel an L-Ornithin, und es kommt es zu einer vermehrten Synthese von Polyaminen. Bereits 1983 wurden erhöhte Polyaminspiegel in läsionaler psoriatischer Haut beschrieben⁵¹. Abb. 4.1. zeigt den schematisierten L-Arginin-Stoffwechsel eines psoriatischen Keratinozyten (vgl. Abb. 1.7.).

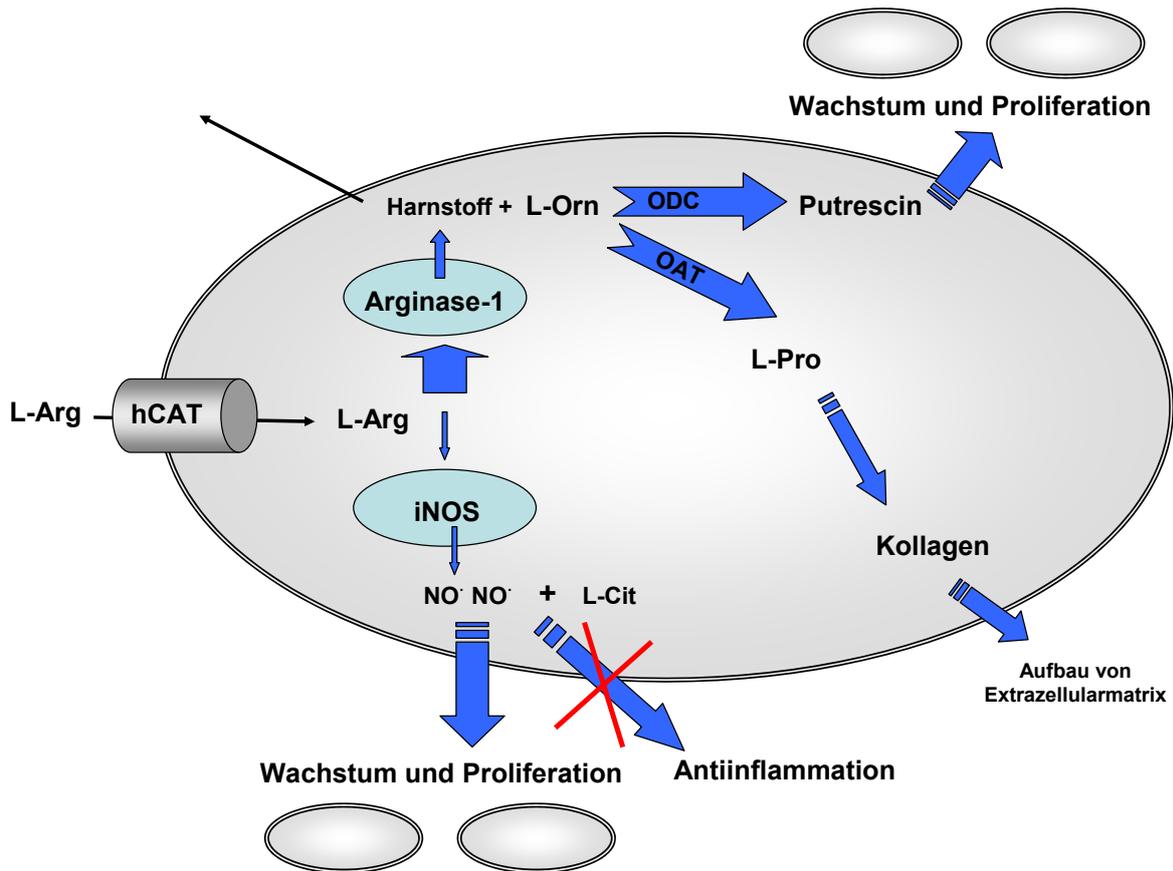


Abb. 4.1. Schematisierte Pathophysiologie des L-Arginin-Stoffwechsels in psoriatischen Keratinozyten (vgl. mit Abb. 1.7.)

In der proinflammatorischen Umgebung des psoriatischen Keratinozyten liegt eine Koexpression von iNOS und Arginase-1 vor. Der überwiegende Teil des intrazellulären L-Arginins wird von der Arginase-1 metabolisiert, gleichzeitig gerät die iNOS unter Substratarmut und setzt wenig NO[•] frei. Die NO[•]-Freisetzung in diesen kleinen Konzentrationen stimuliert die Keratinozytenproliferation und kann keine antiinflammatorischen Effekte induzieren. Der gesteigerte L-Arginin-Metabolismus über die Arginase stellt über die erhöhte Polyaminsynthese einen zusätzlichen Wachstumsstimulus dar.

Die Koinduktion von iNOS und Arginase-1 in psoriatischer Haut steigert den L-Arginin-Verbrauch psoriatischer Keratinozyten über den physiologischen Bedarf hinaus. Der erhöhte Umsatz und Bedarf an L-Arginin in der Psoriasis macht die hCAT-Isoformen als die für die Zelle bedeutendsten L-Arginin-Transporter zu einer wichtigen Regulationseinheit für die Proliferation bzw. Differenzierung und für die Entzündungsreaktion.

4.1.1. Mögliche Mechanismen und Auswirkungen der hCAT-1-mRNA-Induktion

Die erhöhte Arginase-1-Expression, die erhöhte Arginaseaktivität und die hohen Polyaminspiegel (siehe Kap. 4.1.) in psoriatischer Haut machen hCAT-1 wahrscheinlich zu einem relevanten Einflussfaktor auf molekularer Ebene für die Psoriasis. Als basaler,

Diskussion

konstitutiv exprimierter Transporter trägt hCAT-1 maßgeblich zu dem L-Arginin-Influx für die Aufrechterhaltung der Arginaseaktivität bei.

In der vorliegenden Arbeit wird eine deutliche Induktion der hCAT-1-mRNA in läsionaler, wie in nicht-läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut gezeigt (Abb. 3.1). Die Ausprägung dieses Befundes ist insoweit ein überraschendes Ergebnis, da hCAT-1 üblicherweise konstitutiv exprimiert und eine Regulation in geringerem Maße als für hCAT-2B stattfindet (siehe Kap. 1.4.1., Abb. 1.6.).

Fernandez *et al*⁵² zeigten 2003 in Ratten-Gliom-Zellen, dass es durch physiologischen Stress zu einer Expressionssteigerung der hCAT-1-mRNA kommt. Die Molekularpathologie der Psoriasis ist ebenfalls durch erhöhten Stress aufgrund von Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet (siehe Kap.1.2.). Die inflammatorische Umgebung psoriatischer Plaques wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass es in läsionaler psoriatischer Haut zu einer hCAT-1-mRNA-Induktion kommt. Eine wie in diesem Fall beobachtete erhöhte Expression in unbefallener, nicht entzündeter Haut, lässt sich durch diese Hypothese jedoch nicht erklären.

Ein möglicher Mechanismus dieser Induktion wäre, dass es durch die Überexpression und der gesteigerten Aktivität der Arginase-1 zu einer lokalen L-Arginin-Mangelsituation kommt. Um den Substratbedarf der Arginase und iNOS in psoriatischer Haut zu decken, kommt es zu einer reflektorischen hCAT-1-Hochregulation. Dieser Vorgang wäre als ein Adaptations- bzw. Kompensationsmechanismus an erniedrigte extrazelluläre L-Arginin-Konzentrationen anzusehen. Je weniger L-Arginin vorhanden ist, desto stärker wird hCAT-1 induziert, um vermehrt L-Arginin in die Zelle zu transportieren.

Induktionen von h-CAT-1-mRNA durch die verminderte Verfügbarkeit an kationischen Aminosäuren sind beschrieben (siehe Kap. 1.4.1.). Untersuchungen zu Plasmaspiegeln aller 20 proteinogenen Aminosäuren bei Psoriatikern haben gezeigt, dass die L-Arginin-Konzentrationen in Psoriatikern deutlich erniedrigt sind⁴⁸. Die Konzentration des L-Ornithins, dem Produkt der Arginase und Vorläufer der Polyamine, ist im Plasma psoriatischer Patienten entsprechend signifikant erhöht. Bei den anderen 18 proteinogenen Aminosäuren wurden keine Konzentrationsunterschiede zwischen Psoriatikern und gesunden Kontrollen gemessen. Unter Annahme einer Hochregulation von hCAT-1 durch einen Mangel an L-Arginin wäre das Ergebnis erklärbar, dass es auch in nicht akut entzündeter psoriatischer Haut zu einer hCAT-1-mRNA Induktion kommt.

Diese Ergebnisse weisen auf eine entscheidende Rolle dieser beiden Aminosäuren für die Pathophysiologie der Psoriasis hin. Auch posttranskriptionelle Mechanismen wie Erhöhung

der mRNA-Stabilität, wie für Ratten-Gliom- und NRK-Nierenzellen beschrieben⁵³, könnten für die hohen mRNA-Transkriptzahlen von hCAT-1 eine Rolle spielen.

Die in Tab. 3.2. dargestellten frühen Cps. für hCAT-1 in psoriatischer Haut lassen schließen, dass auf mRNA-Ebene der für gewöhnlich konstitutiv exprimierte hCAT-1 bei Psoriatikern stärker exprimiert wird als hCAT-2B.

Trotz dieser erhöhten hCAT-1-mRNA-Expression scheint der iNOS zu wenig Substrat für eine maximale NO⁻-Synthese zur Verfügung zu stehen, um der Inflammation und der epidermalen Hyperproliferation entgegenwirken zu können (siehe Kap. 1.4.2.). Dies wirft die Frage auf, inwieweit das hCAT-1-Protein L-Arginin spezifisch für die iNOS bzw. spezifisch für die Arginase-1 bereitstellt.

Es wurde in vorangegangenen Arbeiten die These aufgestellt, dass sich die iNOS und die Arginase-1 möglicherweise verschiedener intrazellulärer L-Arginin-Speicher bedienen⁵⁴.

An Makrophagen wurde ein Modell der intrazellulären Kompartimentierung des L-Arginins entwickelt und diskutiert, das für die Molekularbiologie der Psoriasis von Bedeutung sein könnte (Abb. 4.1.). Hier existieren möglicherweise zwei austauschbare L-Arginin-Reservoirs; hCAT-1 vermittelt den Austausch für Reservoir 1A, hCAT-2B sorgt für den In- und Eflux für Reservoir 1B, aus welchem die iNOS wahrscheinlich ihr Substrat bezieht⁴⁴. Ob L-Arginin zwischen den beiden Reservoirs austauschbar ist, bleibt noch zu klären.

Das Ergebnis, dass hCAT-1-mRNA in psoriatischer Haut ca. um den Faktor zehn hochreguliert ist (Abb. 3.1.), die iNOS aber wahrscheinlich an Substratarmut leidet, spricht gegen eine freie Austauschbarkeit beider Reservoirs untereinander. Der Großteil des verfügbaren L-Arginins wird vermutlich wie gewöhnlich physiologischerweise von der Arginase-1 umgesetzt. Die Folge wäre eine gesteigerte Polyaminbildung und eine geringe NO⁻-Freisetzung. Neben den wachstumsstimulierenden Polyaminen sind wahrscheinlich insbesondere die niedrigen NO⁻-Konzentrationen für die epidermale Hyperproliferation in der Psoriasis verantwortlich.

Über die Expression und Aktivität des hCAT-1-Proteins in psoriatischer Haut konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussagen gemacht werden, da in dieser Arbeit kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand.

4.1.2. Relevanz der hCAT-2A-mRNA-Expression

Transkripte des „Leber-Typ“-hCAT-2A-Gens finden sich in gesunder- und psoriatischer Haut. Eine leichte, jedoch nichtsignifikante Erhöhung der mRNA-Expression ist in läsionalen Biopsien verglichen mit gesunder Haut zu erkennen (Abb. 3.2.).

Es ist bekannt, dass hCAT-2A konstitutiv stark in der Leber und glatten Muskelzellen exprimiert wird. Andere wenige Zellarten zeigen erst nach Zytokininduktion eine leichte hCAT-2A-mRNA-Expression⁵⁵.

Überraschend und in dieser Arbeit erstmalig beschrieben ist die Tatsache, dass dieses Gen überhaupt in menschlicher Haut exprimiert wird. Verglichen mit hCAT-1 und hCAT-2B (Tab. 3.2.) scheint es allerdings in geringerer Kopienzahl exprimiert zu werden.

Da hCAT-2A wenig substratspezifisch für L-Arginin ist (Tab. 1.2.), ist zu vermuten, dass dieser Transporter weniger zum direkten L-Arginin-Transport in Keratinozyten beiträgt als hCAT-1 und hCAT-2B.

Eine von Baydoun⁵⁶ an glatten Muskelzellen der Rattenaorta beschriebene signifikante Induktion durch IFN- γ -Stimulation wird nicht beobachtet. Trotz erhöhter Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen und v.a. an IFN- γ in psoriatischen Plaques⁵⁷ findet sich eben keine Induktion der hCAT-2A-mRNA in entzündeter psoriatischer Haut. Dieses Phänomen in psoriatischer Haut geht mit dem Ergebnis der fehlenden hCAT-2B-Induktion einher, da beide Transporter durch dasselbe Gen kodiert werden.

Die Regulation von hCAT-2A ist durch das gemeinsame hCAT-2-Gen bis zum alternativen Spleißen mit der Regulation der Isoform hCAT-2B identisch (siehe Kap. 1.4.1.).

Daher spielen höchstwahrscheinlich posttranskriptionale und posttranslationale Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle für das abweichende Verhältnis von hCAT-2A zu hCAT-2B in menschlicher Haut (Tab. 3.2.). Ob die Substratverfügbarkeit von hCAT-2A auch an ein bestimmtes intrazelluläres L-Arginin-Reservoir gebunden ist, blieb bisher ungeklärt.

Auch für Expression- und Aktivität des hCAT-2A-Proteins in psoriatischer Haut konnten wegen nicht zur Verfügung stehender spezifischer Antikörper keine Aussagen gemacht werden. Somit ist keine eindeutige Aussage über die Relevanz von hCAT-2A in menschlicher Haut zu treffen.

4.1.3. Fehlende hCAT-2B-Induktion als vermutete Ursache einer Substratarmut der iNOS in psoriatischen Läsionen

Es sind keine Expressionsunterschiede beim hCAT-2B-mRNA-Transkript zwischen gesunder und psoriatischer Haut zu erkennen. In der Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine in psoriatischer Haut kommt es überraschenderweise nicht zu einer hCAT-2B-mRNA-Induktion. Entgegen bisheriger Ergebnisse (siehe Kap. 1.4.1.) ist der üblicherweise unter inflammatorischen Bedingungen induzierbare hCAT-2B in gesunder nicht entzündeter Haut stärker exprimiert als der konstitutive hCAT-1 (Tab. 3.2.). Weiterhin lässt sich keine Expressionsdifferenz zwischen läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut beobachten. Eine Koinduktion von iNOS und hCAT-2B, wie sie bei anderen Entzündungsprozessen häufig beschrieben wurde⁵⁸, findet sich also nicht in der Psoriasis. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass für eine andauernde NO[•]-Produktion durch die iNOS die Aktivität von hCAT-2 erforderlich ist⁵⁹. Trotz hoher Konzentrationen proinflammatorischer Th1-Zytokine und verhältnismäßig niedriger Konzentrationen antiinflammatorischer Th2-Zytokine⁶⁰ wird keine Induktion beobachtet. Die Expression von hCAT-1 hingegen (siehe Kap. 4.1.1.) wird sowohl in läsionaler wie nicht-läsionaler Haut induziert.

Anhand der Befunde zu hCAT-2B in psoriatischer Haut lässt sich nochmals das Modell eines iNOS-spezifischen intrazellulären L-Arginin-Reservoirs diskutieren (Kap. 4.1.2.).

Die Substratverfügbarkeit der iNOS, und damit die kontinuierliche Aktivität des Enzyms, scheint an das mit L-Arginin-supplementierte Reservoir Nr. 1B gebunden zu sein (Abb. 1.4.). Die Ergebnisse der hCAT-2B-Real-time-PCR sprechen dafür, dass es durch fehlende Induktion von hCAT-2B zu einem Substratmangel für die iNOS und somit zu verminderter NO[•]-Synthese kommt. Der Hyperproliferation und Entzündung kann durch diese niedrige NO[•]-Freisetzung nicht entgegengewirkt werden. Diese geringen NO[•]-Konzentrationen als Folge der Arginase-1-Überexpression und Aktivität stimulieren die Zellproliferation der epidermalen Keratinozyten (Kap. 1.3.1.). Zusätzlich kommt es durch das L-Ornithin-Stoffwechselprodukt L-Prolin wahrscheinlich zu einer gesteigerten Kollagensynthese. Freigesetztes Kollagen kann anschließend für die Bindegewebssynthese und die Angiogenese der Dermis verwendet werden. Die Durchblutung des Gewebes nimmt zu. Es kommt zu Rötung, Schwellung und durch die gesteigerte Durchblutung wird die Entzündungssituation zusätzlich unterstützt.

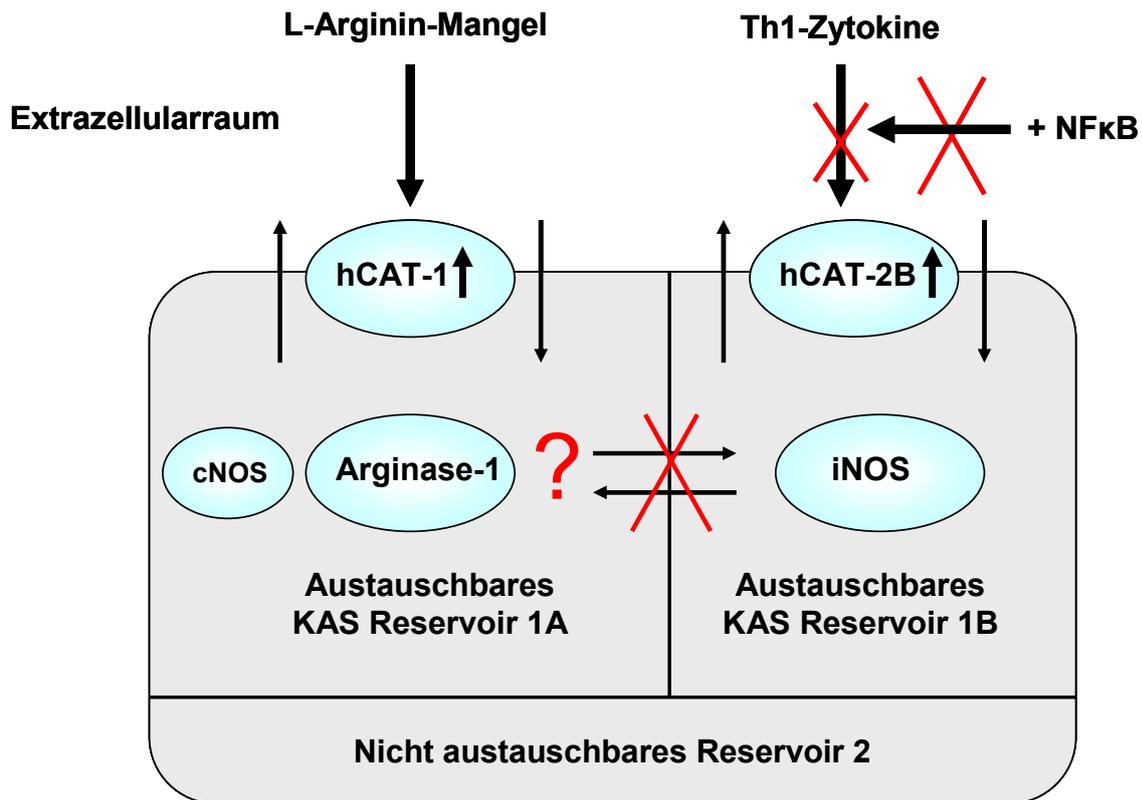


Abb. 4.2. Intrazelluläre L-Arginin-Reservoirs und ihre Bedeutung für die Psoriasis (modifizierte Abb. von Verrey *et al.* 2004⁴⁴)

Das austauschbare Reservoir kationischer Aminosäuren 1A wird durch das hCAT-1-Protein mit L-Arginin gespeist. Die beiden Enzyme Arginase-1 und die cNOS metabolisieren L-Arginin dieses Reservoirs. Die iNOS bezieht L-Arginin aus Reservoir 1B, welches der induzierbare hCAT-2B supplementiert. Ob Reservoir 1A und 1B untereinander L-Arginin austauschen können, ist unklar. In der Psoriasis wird hCAT-1 wahrscheinlich durch einen L-Arginin-Mangel hochreguliert. Zu einer Induktion von hCAT-2B kommt es wahrscheinlich wegen einer Disregulation des NFκB-Signalweges nicht. Reservoir 2 ist nicht frei austauschbar mit dem Extrazellulärraum und ist in diesem Zusammenhang von untergeordneter Rolle.

Die Tatsache, dass unter den proinflammatorischen Bedingungen der Psoriasis die Arginase-1 entgegen der normalen Physiologie hochreguliert wird, hCAT-2B jedoch nicht, spricht für eine Störung der entsprechenden zytokinabhängigen Signalwege bei Psoriatikern.

Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass eine Dysregulation der NFκB-abhängigen Koinduktion von iNOS und hCAT-2B in der Psoriasis vorliegen könnte, welche für andere Zellarten beschrieben wurde⁶¹. Konkordant zu den Befunden an murinen Keratinozyten⁶² hat die in der Psoriasis verminderte L-Arginin-Konzentration für die hCAT-2-mRNA nicht den expressionsinduzierenden Effekt, wie er für hCAT-1 nachgewiesen werden konnte. Die Arbeit zeigt auch, dass durch eine erniedrigte L-Arginin-Konzentration über eine NFκB-Bindung eine mRNA-Expressionsinduktion der iNOS stattfindet, die Translation in das iNOS-Protein aber vermindert ist. Folge davon ist die Stimulierung der Zellproliferation durch eine niedrige NO-Freisetzung. Falls das Modell der intrazellulären

Kompartimentierung des L-Arginins in der Psoriasis zutrifft, würde das wenig exprimierte iNOS-Protein zusätzlich unter einer Substratarmut leiden.

Auch über das hCAT-2B-Protein konnten wegen fehlender Verfügbarkeit spezifischer Antikörper keine Aussagen gemacht werden.

4.2. Effekte von UV-B-Bestrahlung auf den L-Arginin-Metabolismus in menschlichen Keratinozyten

4.2.1. Effekte auf die Substratverfügbarkeit der iNOS durch UV-B-abhängige hCAT-2B-mRNA-Induktion

Durch UV-B-Bestrahlung kommt es in zytokinaktivierten Keratinozyten zu einer deutlichen dosisabhängigen Induktion von hCAT-2B auf mRNA-Ebene. Zytokinaktivierung alleine führt wie für den induzierbaren hCAT-2B erwartet zu einer ungefähren Verdoppelung der mRNA gegenüber residenten Zellen. (Abb. 3.6.). Alle zytokinaktivierten Keratinozyten zeigen eine deutliche Induktion von hCAT-2B gegenüber den residenten Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es bei einer „normalen und kontrollierten“ Entzündungssituation in menschlichen Keratinozyten zu einer NF κ B-vermittelten hCAT-2B-Induktion kommt, während dieser Mechanismus in der Psoriasis gestört zu sein scheint (Abb. 4.1., siehe Kap. 4.1.3.).

Bei einer Bestrahlung mit 20 mJ/cm² werden in Gegenwart von Zytokinen eine ca. neunfache Induktion und eine ca. dreifache Induktion bei den residenten Zellen gegenüber unbestrahlten residenten Keratinozyten beobachtet.

Durch die erhöhte hCAT-2B-mRNA-Induktion wird es wahrscheinlich auch zu einer vermehrten Expression und Aktivität des hCAT-2B-Proteins kommen.

Dieses hCAT-2B-Protein würde durch vermehrten L-Arginin-Transport in das für die iNOS-spezifische intrazelluläre L-Arginin-Reservoir die Substratverfügbarkeit für die iNOS erhöhen. Es wurde bereits beschrieben, dass es durch alle drei NOS-Isoformen nach Bestrahlung mit UV-B-Licht in menschlicher Haut zu einer NO[•]-Freisetzung in der Epidermis und Dermis^{63,64} kommt.

Das in mit UV-B bestrahlten Keratinozyten exprimierte iNOS-Protein kann L-Arginin metabolisieren und synthetisiert entsprechend der Enzymeigenschaften kontinuierlich hohe NO[•]-Konzentrationen. Diese durch UV-B-Bestrahlung induzierten hohen

NO'-Konzentrationen können nun antiinflammatorische und antiproliferative Effekte auf die Keratinozyten entfalten.

Übertragen auf das Krankheitsbild der Psoriasis würde dies bedeuten, dass nach UV-B-Therapie erhöhte Mengen an NO' freigesetzt werden, welche die Hyperproliferation und Entzündungsreaktion der Plaques inhibieren; der Therapieerfolg stellt sich ein.

Die Tatsache, dass es in läsionaler wie nicht-läsionaler Haut zu keiner hCAT-2B-Induktion kommt (Abb. 3.3.), nach Aktivierung menschlicher Keratinozyten *in vitro* jedoch eine deutliche Induktion zu sehen ist, spricht für eine Störung der Signalübertragung in der Psoriasis. Da die Arginaseaktivität in aktivierten Zellen nach UV-B-Bestrahlung zwar signifikant (Abb. 3.9.), aber im Verhältnis zur deutlichen Expressionsinduktion der hCAT-2B-mRNA nur gering gehemmt wird, ist davon auszugehen, dass die erhöhte Substratverfügbarkeit für die iNOS maßgeblich durch die hCAT-2B-Hochregulation bedingt ist. Auf die Analyse des Transporters hCAT-2A wurde in diesem Zusammenhang wegen der geringen Expression der mRNA und nicht zur Verfügung stehender Antikörper verzichtet.

4.2.2. UV-B-induzierte Arginasehemmung als möglicher Mechanismus einer erhöhten L-Arginin-Verfügbarkeit für die iNOS

Die Bestrahlung von Keratinozyten mit UV-B führt in residenten wie in aktivierten Zellen zu einer erniedrigten Arginase-1-mRNA-Expression (Abb. 3.8.), wie auch zu einer verminderten Arginaseaktivität (Abb. 3.9.). Der Transporter hCAT-1 (Abb. 3.7.) zeigt in residenten Zellen ab einer Bestrahlung von 10mJ/cm² einen signifikanten Abfall auf mRNA-Ebene.

Die Arginase-1-mRNA-Expression, die Arginaseaktivität und die Expression der hCAT-1-mRNA lassen sich nur im Zusammenhang diskutieren, da hCAT-1 als basaler L-Arginin-Transporter die primär wichtigste Quelle an L-Arginin für das Arginaseprotein ist. Durch die verminderte Arginase-1-mRNA-Expression und durch die gehemmte Enzymaktivität sinkt der intrazelluläre Umsatz an L-Arginin. Durch diesen verminderten L-Arginin-Umsatz erhöhen sich die L-Arginin-Konzentrationen. Die iNOS leidet wahrscheinlich nicht mehr unter Substratarmut und kann NO' in hohen Konzentrationen freisetzen.

Die erniedrigte Expression der Arginase-1-mRNA und die durch UV-B-Bestrahlung und Zytokinaktivierung gehemmte Arginaseaktivität liefert auch eine Erklärung für die Hemmung der hCAT-1-mRNA-Expression. Durch einen erniedrigten L-Arginin-Umsatz aufgrund der Arginaseaktivitätshemmung steigt der L-Arginin-Spiegel. Die hCAT-1-Transkription und

Diskussion

Translation wird reflektorisch gehemmt (Tab. 1.2.). Eine mögliche und wahrscheinliche Erklärung für dieses Phänomen wäre ein negativer Feedback-Mechanismus. Eine Hochregulation von hCAT-1 durch intrazelluläre L-Arginin-Depletion ist beschrieben⁴⁸. So wäre im Gegenzug eine Hemmung durch erhöhte L-Arginin-Spiegel als Mechanismus anzunehmen. Diese Ergebnisse zeigen wie schon häufig beobachtet, dass es unter „physiologisch ablaufenden“ Entzündungssituationen in menschlichen Keratinozyten zu einer Arginase-1-Hemmung kommt. Die Pathophysiologie entzündeter psoriatischer Läsionen zeigt dagegen eine Arginase-1-Überexpression und gesteigerte Polyaminspiegel durch eine erhöhte Arginaseaktivität. Die molekularen Pathomechanismen der gestörten Signaltransduktion in der Psoriasis sind bisher nicht ausreichend geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.3. Ausblick

Die starke Arginase-1-Expression und die fehlende Koinduktion von hCAT-2B scheint die iNOS-Aktivität in psoriatischer Haut zu limitieren. Die Überexpression der Arginase in läsionaler Haut verursacht einen hohen L-Arginin-Umsatz und eine Erniedrigung der L-Arginin-Konzentrationen. *In vitro* wurde gezeigt, dass L-Arginin-Deprivation zu einem Wachstumsstopp von gesunden Zellen und einem selektiven Absterben von malignen Tumorzellen führt⁶⁵. In der L-Arginin-Mangelsituation der Psoriasis würde wegen der in der NO⁻-Synthese limitierten iNOS hingegen eine Supplementation von L-Arginin vermutlich zu einer erhöhten NO⁻-Freisetzung und einer Besserung der Symptomatik führen. Eine Koinduktion von hCAT-2B könnte ausreichend Substrat für eine lang anhaltende NO⁻-Produktion durch die iNOS bereitstellen. Ein Ansatz in diesem Zusammenhang wäre eine probatorische Therapie mit lokalem, oder auch systemisch appliziertem L-Arginin.

Die Expression und Aktivität der iNOS und Arginase nach UV-B-Therapie in psoriatischen Biopsien sind ein weiterer wichtiger Untersuchungspunkt zukünftiger Experimente. Eine Hemmung der Arginase, wie hier *in vitro* gezeigt, könnte einen molekularen Wirkmechanismus der UV-B-Therapie erklären. Die deutliche UV-B-abhängige Induktion von hCAT-2B erhöht wahrscheinlich die L-Arginin-Verfügbarkeit für die iNOS und dadurch die NO⁻-Synthese.

Die mögliche Existenz iNOS- und Arginase-1-spezifischer Reservoirs in Keratinozyten wird in Zukunft ein Ziel weiterer Untersuchungen sein. Über eine gezielte hCAT-Regulation könnte der lokalen L-Arginin-Mangelsituation möglicherweise entgegengewirkt werden.

Die Proteinexpression der hCAT-Isoformen in Keratinozyten und die Bestimmung von L-Arginin-Transportkinetiken über die Zellmembran sollten weitere Hinweise für die Pathophysiologie der Psoriasis bringen.

Die Regulation der L-Arginin-metabolisierenden Enzyme iNOS und Arginase sowie der L-Arginin-transportierenden hCAT-Isoformen könnte in Zukunft bedeutende therapeutische Ansätze und Konsequenzen für die Behandlung der Psoriasis vulgaris bekommen.

5. Zusammenfassung

Die Psoriasis vulgaris ist eine chronische Hauterkrankung, die durch eine epidermale Hyperproliferation und eine begleitende Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist. Wegen ihrer Effekte auf die Zellproliferation und Inflammation ist die Koinduktion der Enzyme iNOS und Arginase für die Psoriasis von pathogenetischer Bedeutung. Über den Transport von L-Arginin, dem Substrat beider Enzyme, können die humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCAT) eine entscheidende Rolle für die Pathophysiologie der Psoriasis spielen.

Die Analyse von Hautbiopsien psoriatischer Patienten und gesunder Probanden ergab eine deutliche mRNA-Expressionsinduktion des Transporters hCAT-1 in psoriatischer Haut.

Der physiologischerweise mit der iNOS koinduzierte Transporter hCAT-2B wird bei Psoriatikern nicht verstärkt exprimiert. Daraus resultiert wahrscheinlich ein Substratmangel für die iNOS. Diese niedrigen freigesetzten NO[•]-Konzentrationen sind ein Proliferationsstimulus für die epidermalen Keratinozyten und vermitteln keine antiinflammatorischen Effekte in entzündeten psoriatischen Plaques.

Um einen Eindruck über die Effekte der UV-B-Therapie bei Psoriatikern zu gewinnen, wurden *in vitro* residente und zytokinaktivierte primäre menschliche Keratinozyten mit UV-B bestrahlt. Die Zytokinaktivierung führt zu einer deutlichen Induktion von hCAT-2B, die Expression der Arginase-1-mRNA und die Arginaseaktivität werden gehemmt. Es wird eine bestrahlungsabhängige Abnahme der hCAT-1-, sowie eine deutliche Zunahme der Expression der hCAT-2B-mRNA bei residenten wie aktivierten Zellen beobachtet.

Über die Hochregulation von hCAT-2B könnte die iNOS ausreichend Substrat beziehen, um genügende NO[•]-Konzentrationen freizusetzen, die antiproliferative und antiinflammatorische Effekte auf die Keratinozyten haben.

Diese Arbeit liefert Hinweise für potentiell wichtige molekulare Pathomechanismen in psoriatischen Keratinozyten, sowie eine Hypothese für die Besserung der Symptomatik nach UV-B-Therapie. Die Ergebnisse unterstützen die Diskussion spezifischer intrazellulärer L-Arginin-Reservoirs, aus denen iNOS und Arginase-1 möglicherweise getrennt voneinander ihr Substrat beziehen.

Die Regulation der iNOS und Arginase, sowie der substratbereitstellenden hCAT-Isoformen, könnten einen neuen therapeutischen Ansatz für die Kontrolle der NO[•]-Synthese bei Psoriasis darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Altman,E.M. & Kamino,H. Diagnosis: Psoriasis or not? What are the clues? *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* **18**, 25-35 (1999).
2. Bowcock,A.M. Psoriasis genetics: The way forward. *Journal of Investigative Dermatology* **122**, XV-XVII (2004).
3. Kormeili,T., Lowe,N.J. & Yamauchi,P.S. Psoriasis: immunopathogenesis and evolving immunomodulators and systemic therapies; US experiences. *British Journal of Dermatology* **151**, 3-15 (2004).
4. Henseler,T. Genetics of psoriasis. *Archives of Dermatological Research* **290**, 463-476 (1998).
5. Detmar,M. *et al.* Overexpression of Vascular-Permeability Factor Vascular Endothelial Growth-Factor and Its Receptors in Psoriasis. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 1141-1146 (1994).
6. Hohler,T. & Marker-Hermann,E. Psoriatic arthritis: clinical aspects, genetics, and the role of T cells. *Current Opinion in Rheumatology* **13**, 273-279 (2001).
7. Cuellar,M.L. & Espinoza,L.R. Psoriatic arthritis. Current developments. *J. Fla. Med. Assoc.* **82**, 338-342 (1995).
8. de Korte,J., Sprangers,M.A.G., Mombers,F.M.C. & Bos,J.D. Quality of life in patients with psoriasis: A systematic literature review. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **9**, 140-147 (2004).
9. Chamian,F. & Krueger,J.G. Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology* **16**, 331-337 (2004).
10. Bonifati,C. & Ameglio,F. Cytokines in psoriasis. *International Journal of Dermatology* **38**, 241-251 (1999).
11. Lew,W., Lee,E. & Krueger,J.G. Psoriasis genomics: analysis of proinflammatory (type 1) gene expression in large plaque (Western) and small plaque (Asian) psoriasis vulgaris. *British Journal of Dermatology* **150**, 668-676 (2004).
12. Lebwohl,M. & Ali,S. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* **45**, 487-498 (2001).
13. Lebwohl,M. & Ali,S. Treatment of psoriasis. Part 2. Systemic therapies. *Journal of the American Academy of Dermatology* **45**, 649-661 (2001).
14. Weischer,M., Blum,A., Eberhard,F., Rocken,M. & Berneburg,M. No evidence for increased skin cancer risk in psoriasis patients treated with broadband or narrowband

- UVB phototherapy: A first retrospective study. *Acta Dermato-Venereologica* **84**, 370-374 (2004).
15. Fredriksson,T. & Pettersson,U. Severe Psoriasis - Oral Therapy with A New Retinoid. *Dermatologica* **157**, 238-244 (1978).
 16. Bansal,V. & Ochoa,J.B. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **6**, 223-228 (2003).
 17. Satriano,J. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. *Amino Acids* **26**, 321-329 (2004).
 18. Albina,J.E., Abate,J.A. & Mastrofrancesco,B. Role of Ornithine As A Proline Precursor in Healing Wounds. *Journal of Surgical Research* **55**, 97-102 (1993).
 19. Li,H. *et al.* Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **280**, E75-E82 (2001).
 20. Wallace,H.M. & Fraser,A.V. Inhibitors of polyamine metabolism: Review article. *Amino Acids* **26**, 353-365 (2004).
 21. Palmer,R.M.J., Ferrige,A.G. & Moncada,S. Nitric-Oxide Release Accounts for the Biological-Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* **327**, 524-526 (1987).
 22. Guzik,T.J., Korbust,R. & Adamek-Guzik,T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology* **54**, 469-487 (2003).
 23. Kuhn,A. *et al.* Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology* **111**, 149-153 (1998).
 24. Krischel,V. *et al.* Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **111**, 286-291 (1998).
 25. Bruch-Gerharz,D., Ruzicka,T. & Kolb-Bachofen,V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Archives of Dermatological Research* **290**, 643-651 (1998).
 26. Kleinert,H., Schwarz,P.M. & Forstermann,U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological Chemistry* **384**, 1343-1364 (2003).
 27. Cho,H.J. *et al.* Calmodulin Is A Subunit of Nitric-Oxide Synthase from Macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **176**, 599-604 (1992).
 28. Kroncke,K.D., Fehsel,K. & Kolbbachofen,V. Inducible Nitric-Oxide Synthase and Its Product Nitric-Oxide, A Small-Molecule with Complex Biological-Activities. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**, 327-343 (1995).

29. Bogdan,C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* **2**, 907-916 (2001).
30. MacMicking,J., Xie,Q.W. & Nathan,C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* **15**, 323-350 (1997).
31. Aktan,F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* **75**, 639-653 (2004).
32. Wu,G.Y. & Morris,S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal* **336**, 1-17 (1998).
33. Hesse,M. *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of Immunology* **167**, 6533-6544 (2001).
34. Boucher,J.L., Moali,C. & Tenu,J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**, 1015-1028 (1999).
35. Knowles,R.G. & Moncada,S. Nitric-Oxide Synthases in Mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249-258 (1994).
36. Jenkinson,C.P., Grody,W.W. & Cederbaum,S.D. Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **114**, 107-132 (1996).
37. White,M.F., Gazzola,G.C. & Christensen,H.N. Cationic Amino-Acid-Transport Into Cultured Animal-Cells .1. Influx Into Cultured Human-Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 4443-4449 (1982).
38. White,M.F. & Christensen,H.N. Cationic Amino-Acid-Transport Into Cultured Animal-Cells .2. Transport-System Barely Perceptible in Ordinary Hepatocytes, But Active in Hepatoma-Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 4450-4457 (1982).
39. Mann,G.E., Yudilevich,D.L. & Sobrevia,L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological Reviews* **83**, 183-252 (2003).
40. Kim,J.W., Closs,E.I., Albritton,L.M. & Cunningham,J.M. Transport of Cationic Amino-Acids by the Mouse Ecotropic Retrovirus Receptor. *Nature* **352**, 725-728 (1991).
41. Bussolati,O. *et al.* Characterization of Amino-Acid-Transport in Human Endothelial-Cells. *American Journal of Physiology* **265**, C1006-C1014 (1993).
42. Kavanaugh,M.P. Voltage-Dependence of Facilitated Arginine Flux Mediated by the System Y+ Basic-Amino-Acid Transporter. *Biochemistry* **32**, 5781-5785 (1993).
43. Hammermann,R., Brunn,G. & Racke,K. Analysis of the genomic organization of the human cationic amino acid transporters CAT-1, CAT-2 and CAT-4. *Amino Acids* **21**, 211-219 (2001).

44. Verrey, F. *et al.* CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **447**, 532-542 (2004).
45. Closs, E.I., Graf, P., Habermeier, A., Cunningham, J.M. & Forstermann, U. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: Three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* **36**, 6462-6468 (1997).
46. Hyatt, S.L., Aulak, K.S., Malandro, M., Kilberg, M.S. & Hatzoglou, M. Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19951-19957 (1997).
47. Schnorr, O., Suschek, C.V. & Kolb-Bachofen, V. The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* **120**, 1016-1022 (2003).
48. Schnorr, O. *et al.* Arginase-1 overexpression induces cationic amino acid transporter-1 in psoriasis. *Free Radical Biology and Medicine* **38**, 1073-1079 (2005).
49. Schnorr, O., Wolf, R., Suschek, C., Tartler, U. & Kolb-Bachofen, V. A molecular explanation for the "iNOS/psoriasis paradox". *Free Radical Biology and Medicine* **35**, S88-S89 (2003).
50. Bruch-Gerharz, D. *et al.* Arginase 1 overexpression in psoriasis - Limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *American Journal of Pathology* **162**, 203-211 (2003).
51. Lauharanta, J. & Kapyaho, K. Arginase Activity and Polyamine Biosynthesis in Psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica* **63**, 277-282 (1983).
52. Fernandez, J. *et al.* Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, Cat-1, by physiological stress. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50000-50009 (2003).
53. Aulak, K.S. *et al.* Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30424-30432 (1999).
54. Closs, E.I., Scheld, J.S., Sharafi, M. & Forstermann, U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: Role of cationic amino acid transporters. *Molecular Pharmacology* **57**, 68-74 (2000).
55. Simmons, W.W., Closs, E.I., Cunningham, J.M., Smith, T.W. & Kelly, R.A. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 11694-11702 (1996).
56. Baydoun, A.R. *et al.* Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal* **344**, 265-272 (1999).
57. Griffiths, C.E.M. The immunological basis of psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **17**, 1-5 (2003).

Literaturverzeichnis

58. Nicholson,B., Manner,C.K., Kleeman,J. & MacLeod,C.L. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 15881-15885 (2001).
59. Kakuda,D.K., Finley,K.D., Maruyama,M. & MacLeod,C.L. Stress differentially induces cationic amino acid transporter gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1414**, 75-84 (1998).
60. Craven,N.M. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in psoriasis. *British Journal of Dermatology* **144**, 849-853 (2001).
61. Kawahara,K. *et al.* Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Molecular Brain Research* **90**, 165-173 (2001).
62. Kagemann,G., Sies,H. & Schnorr,O. Limited availability of L-arginine increases DNA-binding activity of NF-kappaB and contributes to regulation of iNOS expression. *J. Mol. Med.* **85**, 723-732 (2007).
63. Kuhn,A. *et al.* Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology* **111**, 149-153 (1998).
64. Warren,J.B. Nitric-Oxide and Human Skin Blood-Flow Responses to Acetylcholine and Ultraviolet-Light. *Faseb Journal* **8**, 247-251 (1994).
65. Wheatley,D.N., Philip,R. & Campbell,E. Arginine deprivation and tumour cell death: Arginase and its inhibition. *Molecular and Cellular Biochemistry* **244**, 177-185 (2003).

7. Anhang

Abkürzungen

µl	Mikroliter
bp	Basenpaar
CAT	kationische Aminosäuretransporter
cDNA	copyDNA
cNOS	konstitutive NO-Synthase
Cp.	<i>Crossing Point</i>
CRP	C-reaktives-Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und Andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
hCAT	humaner kationischer Aminosäuretransporter
hGAPDH	humane Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	kiloDalton
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
L-Lys	L-Lysin
L-Orn	L-Ornithin
L-Pro	L-Prolin
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO'-Synthase
NO'	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OAT	Ornithin-Aminotransferase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PASI	Psoriasis Area Severity Index
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PsA	psoriatische Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungen

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SD	empirische Standardabweichung
STAT-1 α	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription-1α</i>
TAE	Tris-Acetat-Puffer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Unit
urea	Harnstoff
UV	ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Histologie der Epidermis und Dermis.....	1
1.2.	Makroskopisches Bild einer typischen psoriatischen Läsion in der Knieregion	2
1.3.	Histologie eines psoriatischen Plaques zeigt eine epidermale Hyperproliferation. .	3
1.4.	Remission eines Psoriatischen Plaques nach UV-B-Bestrahlungstherapie.....	5
1.5.	Schematisierte Struktur von hCAT-1 in der Zellmembran	10
1.6.	Schematisierter L-Arginin-Stoffwechsel in menschlichen Keratinozyten.....	12
2.2.1.	Real-time-PCR-Protokoll eines hCAT-2B-Laufes.....	21
2.2.2.	Fluoreszenzaufzeichnung während einer hCAT-2B-Real-time-PCR	23
2.2.3.	Auswertung der Light Cycler-PCRs mittels „ <i>RelQuant</i> “	25
3.1.	Quantitative mRNA-Expression von hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B in psoriatischer Haut	27
3.2.	Schmelzkurvenanalyse eines PCR-Amplifikats am Beispiel von hCAT-2B.....	29
3.3.	Schmelzpunktanalyse eines PCR-Amplifikats am Beispiel von hCAT-2B.....	30
3.4.	Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate einer Real-time-PCR für hCAT-2B.....	31
3.5.	Sequenzierung eines PCR-Amplifikats für hCAT-2B zeigt Sequenzhomologie zu hCAT-2B	32
3.6.	Induktion von hCAT-2B-mRNA in Keratinozyten durch Zytokinaktivierung und UV-B.....	34
3.7.	Expressionshemmung von hCAT-1-mRNA in Keratinozyten durch höhere UV-B-Dosen	35
3.8.	Hemmung der Arginase-1-mRNA-Expression in Keratinozyten durch Aktivierung und UV-B.....	37
3.9.	Abnahme der Arginaseaktivität in Keratinozyten durch Aktivierung und UV-B.....	38
4.1.	Schematisierte Pathophysiologie des L-Arginin-Stoffwechsels in psoriatischen Keratinozyten.....	40
4.2.	Intrazelluläre L-Arginin-Reservoirs und ihre Bedeutung für die Psoriasis	45

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1.1.	Affinität und Maximalgeschwindigkeiten der iNOS und Arginase-1	8
1.2.	Biochemische Charakteristika und Regulation der hCAT-Isoformen	11
2.2.1.	Real-time-PCR-Gerät und Material	15
2.1.2.	Light Cycler-Reagenzien und Konzentrationen	16
2.1.3.	Zusammensetzung des TAE-Puffers	16
2.1.4.	Zusammensetzung des Bromphenolblau-Ladepuffers	16
2.2.1.	Reverse-Transkriptase-Ansätze	18
2.2.2.	Pipettierschema bei Light Cycler-PCRs	19
2.2.3.	Light Cycler-PCR-Protokolle, Primer und Accession Nummern	20
3.1.	Klinische Parameter der Psoriasis-Patienten und der gesunden Probanden	26
3.2.	Durchschnittliche Cps. psoriatischer und gesunder Haut für hCAT-1, hCAT-2A und hCAT-2B	33

Publikationen und Kongressbeiträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit

- Tagung **“Nitric Oxide: General and Effector Systems, 2nd International Symposium, October 4-5, 2004“** in der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Poster “Cationic Amino Acid-Transporter Expression in Psoriasis”

Schuiert M, Kagemann G, Wolf R, Sies H, Schnorr O

- Publikation im *Journal FRBM* **2005;38:763-72**

“Arginase-1 overexpression induces cationic amino acid transporter-1 in psoriasis” (PMID: 15780765)

Oliver Schnorr, Maximilian Schuiert, Guido Kagemann, Ronald Wolf, Markus Walz, Thomas Ruzicka, Ertan Mayatepek, Maurice Laryea, Christoph V. Suschek, Victoria Kolb-Bachofen, Helmut Sies

- Tagung **West Coast Salt and Water Club, 24th Annual Meeting**
The Inn at Morrow Bay (California), March 11-12, 2005

Vortrag **“Cocoa Flavonoids Inhibit CFTR”**

- Tagung **“Annual Fall Meeting Berlin / Potsdam 2005” der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“**
September 18–21, 2005, Freie Universität Berlin

Poster „Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia”

Maximilian Schuiert, Helmut Sies, Beate Illek, Horst Fischer

- Publikation im *Journal of Nutrition* **135: 2320-2325, 2005**

“Cocoa-Related Flavonoids Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport across T84 Human Colon Epithelia” (PMID: 16177189)

Maximilian Schuiert, Helmut Sies, Beate Illek and Horst Fischer

Danksagung

Danksagung

- **Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies verpflichtet, der mir diese Arbeit in seinem Institut ermöglicht hat.** Zusätzlich hat er mich weit über meine Dissertation hinaus gefördert und mir jede Möglichkeit gegeben, mich wissenschaftlich zu entfalten.
Ob wissenschaftlich, computertechnisch oder einfach zwischenmenschlich haben wir immer ein professionelles und gleichzeitig freundliches Verhältnis genossen.
- **Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe bedanken.**
Dr. Oliver Schnorr, meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter, danke ich für die intensive Betreuung, Guido Kagemann, Michaela Kuhn und auch Tanja Gross für ihre Hilfestellung bei praktischen Problemen. Ich danke allen für die gute Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Umgang.
- **Der Hautklinik der Universität Düsseldorf danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der untersuchten Biopsien.**
Namentlich möchte ich in diesem Zusammenhang besonders Dr. Ronald Wolf erwähnen.
- **Ganz besondere emotionale Unterstützung im privaten Umfeld habe ich durch meine Eltern Margot Anna Schuier und Franz Josef Schuier erhalten.**
Gerade in schwierigen Zeiten wurde ich durch sie immer wieder motiviert. Kunst und Wissenschaft scheinen sich gut zu ergänzen.
- **„Last but not least“ muss und will ich in dieser Danksagung definitiv Karin Neukam erwähnen.**
Karin Neukam will ich für die netten Gespräche und den „Kaffee Support“ während des Laboralltags danken. Sie ist im Laufe der Zeit auch privat zu einer guten Freundin geworden.
- **Meine kulinarischen Grüße gehen an die Pizzeria Firenze in Heerdt.**
Die zahlreichen leckeren Gerichte und viele nette Unterhaltungen haben mir immer, wenn ich keine Lust und Muße hatte zu kochen, zu einem gefüllten Magen und guter Laune verholfen.
- **Widmen möchte ich diese Arbeit zwei ganz besonderen Menschen.**
Zum einen will ich meinen leider zu früh verstorbenen Onkel Dr. Helmut Haß hervorheben. Bei keinem anderen Menschen habe ich so viel Leidenschaft und Freude an den Naturwissenschaften entdeckt. Er hat einen wesentlichen Teil zu meiner Begeisterung an der Molekularbiologie beigetragen.
Meiner ebenso verstorbenen Großmutter Hanne Ahlert möchte ich besonders gedenken, da sie damals vor über 65 Jahren ihr Humanmedizinstudium zu Gunsten der Familienplanung aufgab.

Lebenslauf

- **Persönliche Angaben:**

Name: Maximilian Schuier
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geboren am: 20.05.1981
Geburtsort: Düsseldorf
Eltern: Margot Anna Schuier, geb. Ahlert, Oberstudienrätin
Dr. Franz Josef Schuier, Facharzt für Neurologie & Psychiatrie

- **Schullaufbahn:**

1987 bis 1991 Bodelschwing-Grundschule in Düsseldorf-Oberkassel
1991 bis 2000 Cecilien-Gymnasium in Düsseldorf-Oberkassel

- Abitur 13. Juni 2000 mit der Durchschnittsnote 2,0
Prüfungsfächer: Biologie, Geschichte, Englisch, Chemie

- **Beruflicher Werdegang:**

01.08.2000 bis 30.06.2001: Zivildienst im Krankenhaus Düsseldorf-Gerresheim im Bereich Krankenpflege der Inneren Medizin
10/2001 bis 02/2008: Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Approbation voraussichtlich Juni/Juli 2008)

- 4.9.2003 Abschlusszeugnis über die Ärztliche Vorprüfung mit der Gesamtnote – befriedigend (3,00) –
- Famulaturen:

01.03.2004 bis 31.03.2004: Famulus in der Abteilung für Neurologie der Rheinischen Kliniken Düsseldorf
08.02.2005 bis 25.03.2005: Famulus im “CHILDREN’S HOSPITAL & RESEARCH CENTER “ in Oakland, Kalifornien
01.08.2005 bis 31.08.2005: Famulus bei Dr. Peter Bielicky, Facharzt für Dermatologie und Allergologie in Düsseldorf
01.08.2006 bis 31.08.2006: Famulus in der Abteilung für Neurologie der Rheinischen Kliniken Düsseldorf

Lebenslauf

Seit 02/2004: Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der HHU-Universität Düsseldorf mit dem Titel:

„Die Bedeutung kationischer Aminosäuretransporter für den L-Arginin-Metabolismus bei Psoriasis“

Referent: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

▪ Publikationen und Kongressbeiträge:

1. Tagung **“Nitric Oxide: General and Effector Systems, 2nd International Symposium, October 4-5, 2004“**, Johannes Gutenberg Universität Mainz

Poster **“Cationic Amino Acid-Transporter Expression in Psoriasis”**

Maximilian Schuier, Guido Kagemann, Ronald Wolf, Helmut Sies, Oliver Schnorr

2. Publikation im *Journal FRBM* **2005;38:763-72**

“Arginase-1 overexpression induces cationic amino acid transporter-1 in psoriasis” (PMID: 15780765)

Oliver Schnorr, Maximilian Schuier, Guido Kagemann, Ronald Wolf, Markus Walz, Thomas Ruzicka, Ertan Mayatepek, Maurice Laryea, Christoph V. Suschek, Victoria Kolb-Bachofen, Helmut Sies

3. Tagung **“West Coast Salt and Water Club, 24th Annual Meeting”**
The Inn at Morrow Bay (California), March 11-12, 2005

Vortrag **“Cocoa Flavonoids Inhibit CFTR”**

4. Tagung **“Annual Fall Meeting Berlin / Potsdam 2005” der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“**
September 18–21, 2005, Freie Universität Berlin

Poster **„Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia”**

Maximilian Schuier, Helmut Sies, Beate Illek, Horst Fischer

5. Publikation im *Journal of Nutrition* **135: 2320-2325, 2005**

“Cocoa-Related Flavonoids Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport across T84 Human Colon Epithelia” (PMID: 16177189)

Maximilian Schuier, Helmut Sies, Beate Illek and Horst Fischer

- 06.05.2008 Abschlusszeugnis über die Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote – befriedigend (3,00) –

05/2008: Erlangen der Approbation als Arzt

Lebenslauf

06/2008: Beginn als Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger, Forschungsschwerpunkt ist das Thema „Experimentelle Hepatologie“

- **Nebentätigkeiten:**

07/2002 bis 10/03: Nebenberufliche Tätigkeit im Bereich Krankenpflege im Dominikus Krankenhaus in Düsseldorf-Heerdt

05/2004 bis 03/05: Studentische Hilfskraft im Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der HHU-Düsseldorf, zuständig für Computeradministration und Netzwerkpflege

10/2007 bis 02/08: Studentische Hilfskraft in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, zuständig für die Koordination der studentischen Lehrveranstaltungen

- **Sprachen:** Deutsch und Englisch fließend in Wort und Schrift.

Düsseldorf, 20.10.2008

Erklärung

Die vorliegende Arbeit habe ich selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt.

Maximilian Schuier

Düsseldorf, den 20.10.2008

Die Bedeutung kationischer Aminosäuretransporter für den L-Arginin-Metabolismus bei Psoriasis

Molekularbiologische Grundlagenforschung der Psoriasis, Dissertation von Maximilian Schuier

Die Psoriasis vulgaris ist eine chronische Hauterkrankung, die durch eine epidermale Hyperproliferation und eine begleitende Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist. Wegen ihrer Effekte auf die Zellproliferation und Inflammation ist die Koinduktion der Enzyme iNOS und Arginase für die Psoriasis von pathogenetischer Bedeutung. Über den Transport von L-Arginin, dem Substrat beider Enzyme, können die humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCAT) eine entscheidende Rolle für die Pathophysiologie der Psoriasis spielen. Die Analyse von Hautbiopsien psoriatischer Patienten und gesunder Probanden ergab eine deutliche mRNA-Expressionsinduktion des Transporters hCAT-1 in psoriatischer Haut. Der physiologischerweise mit der iNOS koinduzierte Transporter hCAT-2B wird bei Psoriatikern nicht verstärkt exprimiert. Daraus resultiert wahrscheinlich ein Substratmangel für die iNOS. Diese niedrigen freigesetzten NO[•]-Konzentrationen sind ein Proliferationsstimulus für die epidermalen Keratinozyten und vermitteln keine antiinflammatorischen Effekte in entzündeten psoriatischen Plaques.

Um einen Eindruck über die Effekte der UV-B-Therapie bei Psoriatikern zu gewinnen, wurden *in vitro* residente und zytokinaktivierte primäre menschliche Keratinozyten mit UV-B bestrahlt. Die Zytokinaktivierung führt zu einer deutlichen Induktion von hCAT-2B, die Expression der Arginase-1-mRNA und die Arginaseaktivität werden gehemmt. Es wird eine bestrahlungsabhängige Abnahme der hCAT-1-, sowie eine deutliche Zunahme der Expression der hCAT-2B-mRNA bei residenten wie aktivierten Zellen beobachtet.

Über die Hochregulation von hCAT-2B könnte die iNOS ausreichend Substrat beziehen, um genügende NO[•]-Konzentrationen freizusetzen, die antiproliferative und antiinflammatorische Effekte auf die Keratinozyten haben.

Diese Arbeit liefert Hinweise für potentiell wichtige molekulare Pathomechanismen in psoriatischen Keratinozyten, sowie eine Hypothese für die Besserung der Symptomatik nach UV-B-Therapie. Die Ergebnisse unterstützen die Diskussion spezifischer intrazellulärer L-Arginin-Reservoirs, aus denen iNOS und Arginase-1 möglicherweise getrennt voneinander ihr Substrat beziehen. Die Regulation der iNOS und Arginase, sowie der substratbereitstellenden hCAT-Isoformen, könnten einen neuen therapeutischen Ansatz für die Kontrolle der NO[•]-Synthese bei Psoriasis darstellen.

Unterschrift Betreuer

Emeritus Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies