

Aus der Forschungsgruppe Immunbiologie der
Hautklinik am Biomedizinischen-Forschungszentrum der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Die Bedeutung von Arginin-Transport und -Metabolismus für die
Entzündungsregulation in der humanen Haut:
Limitierung der iNOS-Aktivität durch Arginase-1 Überexpression als
molekularer Mechanismus der Hyperproliferation in der Psoriasis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Oliver Schnorr
aus Bocholt

Düsseldorf
2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

1. Korreferent: Prof. Dr. Kunz

2. Korreferent: Prof. Dr. Brüne

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	NO-Synthasen	1
1.2.	Molekulare Regulation der induzierbaren NO-Synthase	3
1.3.	Regulation der Substratverfügbarkeit der induzierbaren NO-Synthase	5
1.4.	Chemie des Stickstoffmonoxidradikals NO	7
1.5.	Molekulare Targets von NO	9
1.6.	Bedeutung von NO für die Homöostase der Haut und bei Hauterkrankungen	13
1.7.	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	16

2. Material und Methoden

2.1.	Materialien	17
2.1.1.	Chemikalien	17
2.1.2.	Zytokine und Enzyme	17
2.1.3.	Antikörper	17
2.1.4.	Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur	17
2.1.5.	Verwendung von NO-Donoren	18
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Zellkulturen und Kurzzeit-Organokulturen	18
2.2.2.	Zytokinaktivierung	19
2.2.3.	UV-A Bestrahlung	20
2.2.4.	Bestimmung der NOS-Aktivität mittels Griess-Test	20
2.2.5.	Bestimmung der NOS-Aktivität mittels Diaminonaphtalen	21
2.2.6.	Bestimmung der Arginaseaktivität mittels Harnstoffassay	21
2.2.7.	Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven	22

2.2.8. Bestimmung lebender Zellen mittels Trypanblau-Exklusionstest	22
2.2.9. Quantifizierung der Zellen mit Chromatinkondensation und Zellkernfragmentierung	22
2.2.10. Quantifizierung nekrotischer Zellen	22
2.2.11. Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels in situ nick Translation	23
2.2.12. Immunhistochemische Untersuchungen	23
2.2.13. Immunocytochemische Untersuchungen	23
2.2.14. Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion	24
2.2.15. Bestimmung der iNOS-Promotoraktivität	24
2.2.16. Bestimmung der MSP-Konzentration in humanen Seren mittels ELISA	25
2.2.17. Klonierung der humanen Arginase-1	25
2.2.18. Transfektionen	26
2.2.19. Statistische Analysen	26
3. Ergebnisse	28
3.1. Untersuchungen zum L-Arginin Metabolismus in der Haut	28
3.1.1. Regulation der iNOS unterliegt nicht einem negativen Feedback-Mechanismus	28
3.1.2. Ko-Expression von iNOS und Arginase-1 in humanen Keratinozyten	31
3.1.3. Hemmung der Arginase-1 führt zu erhöhter iNOS-Aktivität	33
3.1.4. Expression kationischer Aminosäure-Transporter in humaner Haut	36
3.1.5. CAT-mediierter L-Arginin-Transport reguliert die Arginase-Aktivität und beeinflusst die Keratinozyten-Proliferation	40

3.2.	Untersuchungen zur Bedeutung der iNOS-Expression und Regulation der iNOS-Aktivität in Entzündungen am Beispiel der entzündlichen, hyperproliferativen Hauterkrankung Psoriasis	43
3.2.1.	Expression der kationischen Aminosäure Transporter CAT-1 und CAT-2 in Hautläsionen von Psoriasis-Patienten	43
3.2.2.	Überexpression der Arginase-1 als limitierender Faktor der NO-Synthese in psoriatischen Keratinozyten	45
3.2.3.	iNOS-Aktivität in Läsionen von Psoriasis-Patienten	46
3.2.4.	Exogenes und endogenes NO hemmen die Keratinozyten-Proliferation	47
3.2.5.	Expression von MSP und RON in der humanen Haut	49
3.2.6.	Regulation der iNOS in der Haut durch MSP	50
3.2.7.	MSP hemmt die iNOS-Expression auf der transkriptionellen Ebene	52
3.2.8.	Effekte von MSP auf die Expression und Aktivität von CAT-2 und Arginase-1	53
3.2.9.	Expression von MSP und RON in Psoriasis-Patienten	55
3.2.10.	Erhöhte MSP-Konzentrationen in den Seren von Psoriasis-Patienten	56
3.3.	Effekte therapeutischer UV-A Dosen auf den L-Arginin Metabolismus in der Haut	58
4.	Diskussion	66
4.1.	Wieviel NO entsteht in den Läsionen von Psoriasis-Patienten <i>in vivo</i> ?	66
4.2.	Relevanz des L-Arginin Transport in der humanen Haut	67
4.3.	Bedeutung der CAT-Expression für die Regulation der iNOS- und Arginase-Aktivität	68
4.4.	Arginase-1 Überexpression in psoriatischen Hautläsionen als limitierender Faktor einer verringerten NO-Synthese	70
4.5.	RON-Überexpression als molekularer Mechanismus der Arginase-1 Überexpression in der Psoriasis	74

4.6. Bedeutung der Effekte therapeutischer UV-A Dosen für den L-Arginin Metabolismus in der Haut	79
5. Literaturverzeichnis	82
6. Zusammenfassung	91
7. Abkürzungen	92
8. Lebenslauf	94
9. Danksagung	97

1. Einleitung

1.1. NO-Synthasen

NO-Synthasen katalysieren in Gegenwart von molekularem Sauerstoff die Reaktion von L-Arginin zu äquimolaren Mengen Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin. Hierbei wird in einer 5-Elektronen Reaktion der Guanidinium-Stickstoff des L-Arginin unter Beteiligung der essentiellen Ko-Faktoren, Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD), Protoporphyrin IX Häm und Tetrahydrobiopterin (BH₄), zum freien Radikal NO oxidiert. Das aktive iNOS Protein ist ein Homo-Dimer, in welchem die N-terminale Oxygenase Domäne die Bindungsstellen für Häm und BH₄ enthält. L-Arginin ist über eine Calmodulin-Bindungsstelle mit der C-terminalen Reduktase Domäne verbunden, wo die Bindungsstellen der Ko-Faktoren FAD, FMN und NADPH lokalisiert sind. (Alderton et al. 2001)

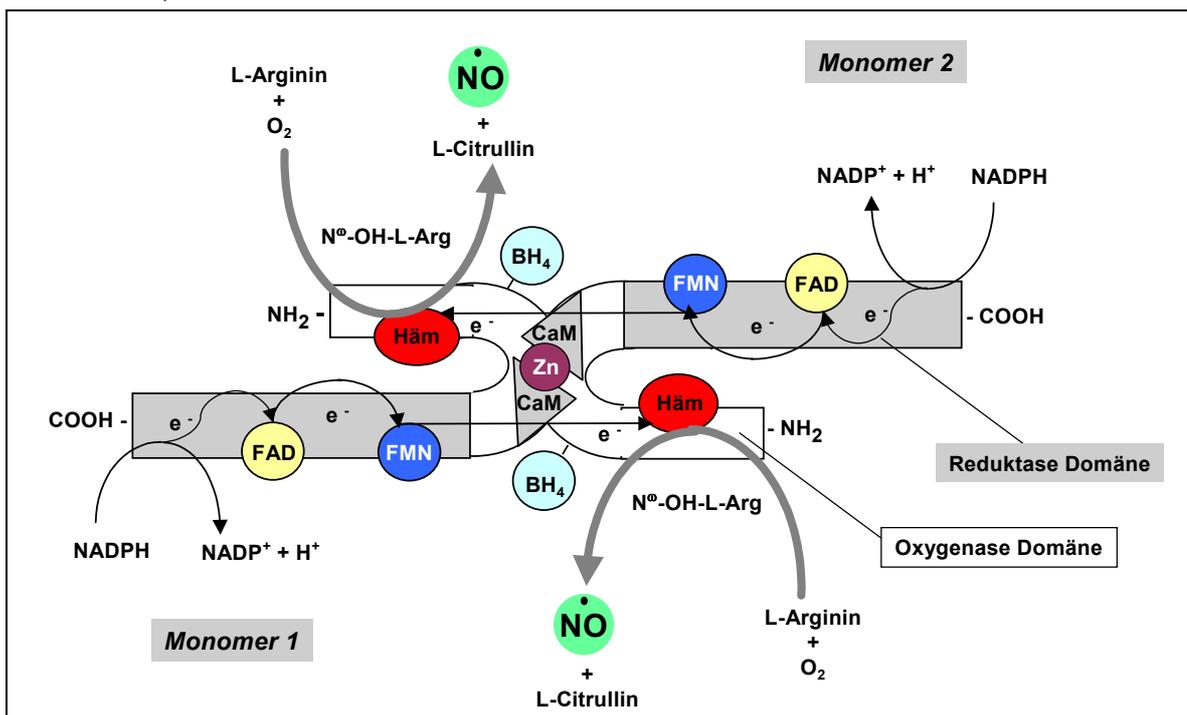


Abb. 1: Schematische Struktur der iNOS und ihrer Ko-Faktoren. Der Elektronenfluss im dimeren iNOS-Protein erfolgt ausgehend vom NADPH über FAD und FMN in der Reduktase Domäne zur Hämgruppe der Oxygenase Domäne des zweiten Monomers. Die Ko-Faktoren erfüllen unterschiedliche Funktionen während des Reaktionsgeschehens. NADPH fungiert als Elektronen-Donor, FAD und FMN als Akzeptoren, wobei durch diese beiden Ko-Faktoren die Übertragung eines zwei-Elektronen Donors (NADPH) auf einen ein-Elektronen-Akzeptor (Häm) ermöglicht wird. Tetrahydrobiopterin erfüllt gleich mehrere Funktionen innerhalb dieser Reaktion, wobei die Stabilisierung des Dimers und die Vermeidung der Produktion von Superoxidanionen durch die Kopplung der Oxidation des NADPH zu NO, essentielle Funktionen einnehmen. Das Endprodukt NO der Oxidation des Guanidinium-Stickstoffs des L-Arginins in Gegenwart von molekularem Sauerstoff enthält das Stickstoffatom der Aminosäure und das Sauerstoffatom des molekularen Sauerstoffs. (modifizierte Abbildung von H. Kleinert)

Drei NOS-Isoformen sind isoliert und kloniert worden und repräsentieren die Produkte dreier unterschiedlicher Gene. Zwei dieser Enzyme sind konstitutiv exprimiert und werden daher als konstitutive NOS (cNOS) bezeichnet. Eine Isoform (eNOS) wurde aus humanen Endothelzellen kloniert (Marsden et al. 1992) kommt aber auch in anderen Zelltypen vor. Die zweite cNOS wurde ursprünglich in Neuronen (nNOS) lokalisiert, doch heute ist die Expression der nNOS ebenfalls in einer Reihe anderer Gewebe und Zelltypen beschrieben (Nakane et al. 1993). Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Ca^{2+} -Calmodulin Bindung (Moncada et al. 1991) bewirken eine Aktivierung der cNOSs und führen zur Synthese niedriger NO-Konzentrationen (pM-Bereich), die pulsatil freigesetzt werden. NO wirkt in diesem Fall als Signalmolekül zur Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase (sGC), wodurch die intrazellulären cGMP-Konzentrationen ansteigen (Denninger and Marletta 1999). Während das durch die eNOS gebildete NO die Relaxation der glatten Muskelzellen bewirkt (Ignarro et al. 2001) und damit eine zentrale Rolle in der Regulation des Gefäßtonus spielt, agiert das von der nNOS synthetisierte NO als Neurotransmitter und steuert wichtige Funktionen des zentralen und peripheren Nervensystems (Bredt et al. 1990). Die dritte Isoform, die induzierbare NOS (iNOS), unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den cNOS Formen, da sie unter physiologischen Bedingungen meist nicht exprimiert ist und erst durch proinflammatorische Zytokine bzw. LPS induziert wird. (Liew et al. 1991). Ist die iNOS einmal exprimiert, synthetisiert sie über einen Zeitraum von einigen Stunden bis hin zu mehreren Tagen, scheinbar unreguliert, hohe NO-Konzentration (μM -Bereich) (Drapier et al. 1988). Erstmals wurde die iNOS Expression in murinen Makrophagen beschrieben, welche durch LPS aktiviert worden waren (Ding et al. 1988). Seitdem ist die iNOS Expression in einer Vielzahl anderer Zellen nach inflammatorischen Stimuli beschrieben worden und die Bedeutung geht weit über die zytotoxischen Effekte im Rahmen der unspezifische Abwehr von Pathogenen hinaus (Kröncke et al. 1995; Kröncke et al. 2001). Alle NOS Isoformen können durch N^G -L-Arginin Derivate inhibiert werden, wobei allerdings drastische Unterschiede hinsichtlich Spezifität und Inhibitionskinetik im Vergleich ihrer Effizienz zwischen den cNOS Isoformen und der iNOS gefunden wurden (Alderton et al. 2001). Da dem NO heute sowohl protektive als auch destruktive Eigenschaften zugeordnet werden, (Green et al. 1990; Kröncke et al. 1991; Suschek et al. 1999), besitzt NO den Charakter eines Janus-köpfigen

Moleküls. Für das Verständnis der NO-vermittelten Effekte sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen war es essentiell, die molekularen Regulations-Mechanismen der NOS zu untersuchen. Die Vielzahl der Publikationen die sich mit der NOS-Regulation beschäftigen, zeigen die Komplexität dieses Themas. Hierbei konnten Regulationsmechanismen auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene charakterisiert werden.

1.2. Molekulare Regulation der induzierbaren NO-Synthase

Das humane iNOS-Gen ist auf dem Chromosom 17 an der Position 17cen-q11.2 lokalisiert (Chartrain et al. 1994), weist eine Länge von ca. 37 kb auf und besteht aus 26 Exons und 25 Introns. Die klonierte humane cDNA besteht aus 4145 Basenpaaren, enthält ein offenes Leseraster von 3459 Basenpaaren und codiert für ein Protein von 1153 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 131 kDa. Die Induktion der iNOS-Expression kann durch Th₁-Zytokine (z.B. IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) oder LPS erreicht werden. Im Gegensatz dazu inhibieren Th₂-Zytokine wie IL-4 oder IL-10, die Expression und Aktivität, wobei mehrere Ausnahmen dieses allgemeinen Mechanismus beschrieben werden. Die Regulation der iNOS Aktivität erfolgt im wesentlichen auf transkriptioneller Ebene. Analysen der Sequenz des humanen iNOS-Promotors zeigten eine Reihe von potentiellen Zytokin-responsiblen Elementen (Abb.2) und Konsensus-Sequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. So wurden innerhalb der ersten 400 Basenpaaren drei Interferon- γ responsible Elemente (γ -IRE) sowie eine NF- κ B Bindestelle gefunden, welche eine Rolle in der IFN- γ bzw. Zytokin- und LPS induzierten Genexpression spielen könnten (Pearse et al. 1991). Ob diese Promotorsequenzen eine funktionelle Bedeutung haben ist immer noch unsicher. Im murinen iNOS Promotor konnte gezeigt werden, dass ein 1.7 kb Segment der 5'-Region LPS- und Zytokin-responsible Promotor-Elemente (in der Region I und II) enthält, durch die eine Induzierbarkeit mit LPS und IFN- γ nachgewiesen werden konnte (Lowenstein et al. 1993). Gravierende Unterschiede dazu ergeben sich in der Regulation durch den humanen iNOS Promotor, da Zytokin-responsible Segmente weiter 5'-wärts zwischen -3.8 und -5.8 kb, -5.8 und -7.0 kb sowie -7.0 und -16.0 kb identifiziert werden konnten. In den noch weiter 5'-wärts liegenden

Regionen konnten keine Zytokin-induzierten Promotoraktivitäten nachgewiesen werden (de Vera et al. 1996).

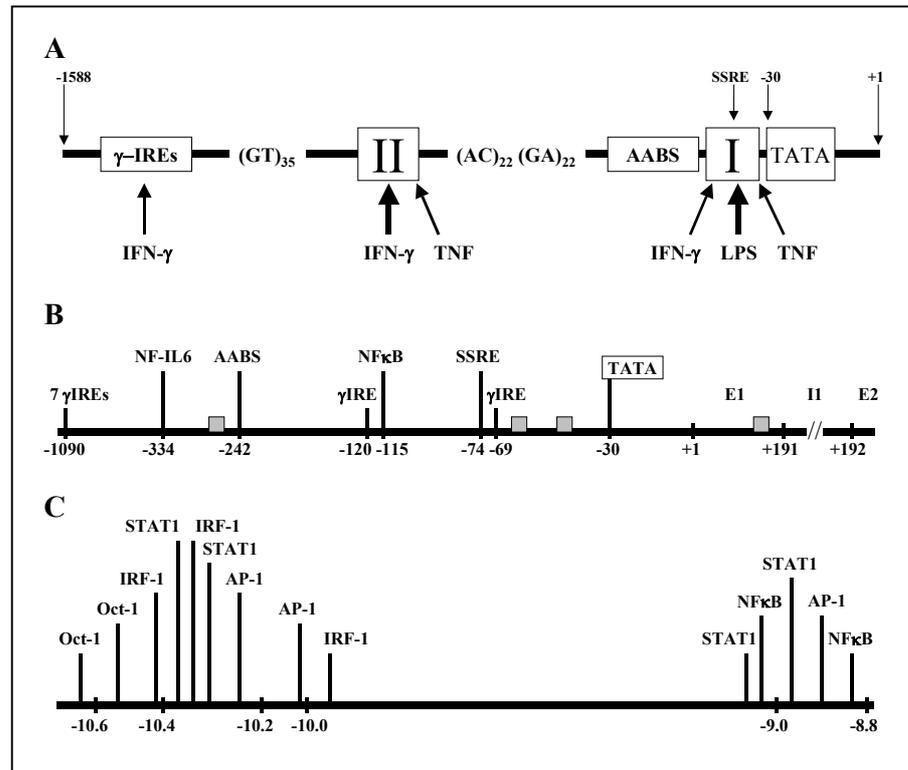


Abb. 2: Struktur der 5'-Region der induzierbaren NO-Synthase. A und B zeigen die TATA-Box bei -30 und den Transkriptionsstart bei +1. TATA-unabhängige iNOS Transkripte haben alternative splice sites an den Positionen -221, -36 und +191. Es sind verschiedene potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet, wobei die SSRE-Box nur im humanen iNOS Gene vorkommt. C Struktur der distalen Region des iNOS-Promotors, welcher als Zytokine-responsibler Enhancer fungiert. Die Region -10,6 kb bis -8,8 kb enthält verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, welche in Abhängigkeit von IFN- γ (IRF-1, STAT-1) oder IL-1 β (AP-1, IRF-1) aktiviert werden und die Promotoraktivität um den Faktor 2 erhöhen.

Gleichermaßen wichtig wie die Aktivierung des iNOS-Promotors ist natürlich die Regulation der Inhibition. So konnte gezeigt, werden dass neben Th₂-Zytokinen auch TGF- β und Glucokortikoide die Aktivität des iNOS-Promotors hemmen (Nathan 1992). In humanen Hepatozyten wurde eine verringerte iNOS Transkription gefunden (Geller et al.), welche durch die Inhibition der Zytokin-stimulierten NF- κ B Aktivität in Folge der Dexamethason-induzierten Erhöhung von I- κ B erklärt werden kann (Kleinert et al. 1996). Die inhibitorischen Eigenschaften von TGF- β treten als Folge regulatorischer Mechanismen sowohl auf transkriptioneller als auch post-transkriptioneller Ebene auf (Perrella et al. 1994; Perrella et al. 1996), wie z.B. durch eine reduzierte Stabilität des iNOS-Proteins (Vodovotz et al. 1993). In murinen Makrophagen konnte gezeigt werden, dass Makrophagen stimulierendes Protein (MSP) ein effektiver Inhibitor der iNOS-

Expression und Aktivität nach Bindung an seinen RON Rezeptor ist (Wang et al. 1994). MSP ist ein 80 kDa Serum-Protein und gehört zu einer Proteinfamilie, der auch der „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) angehört, welche durch drei hoch-konservierte Disulfid Loop Strukturen („Kringel“-Domänen) charakterisiert sind (Danilkovitch and Leonard 1999). Hauptsächlich wird MSP von der Leber synthetisiert und zirkuliert als inaktives „pro-MSP“ im Blut (Wang et al. 1996). Nach der Konvertierung in bio-aktives MSP durch eine spezifische Serin-Protease kann die Bindung an den RON-Rezeptor und dessen Auto-Phosphorylierung erfolgen, wodurch eine Aktivierung der PI₃-Kinase und eine verminderte NF-κB Translokation in den Zellkern vermittelt wird, welche eine Inhibition der iNOS-Expression und -Aktivität zur Folge hat (Chen et al. 1998;Liu et al. 1999). In der Arbeit von Liu et al. konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Deletion des RON Rezeptors sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer erhöhten NO-Synthese führt.

1.3. Regulation der Substratverfügbarkeit der induzierbaren NO-Synthase

Ein effektiver Regulationsmechanismus der iNOS-Aktivität ist die intrazelluläre Verfügbarkeit des Substrats L-Arginin, welche neben der L-Arginin Biosynthese im wesentlichen von der Expression und Aktivität der Transporter für kationische Aminosäuren (CAT) abhängt. Aus der CAT-Familie konnten im humanen System bisher vier Isoformen (CAT-1 bis CAT-4) kloniert und teilweise charakterisiert werden. Die CAT-Proteine sind integrale Membran-Proteine mit 14 Transmembran-Domänen und intrazellulären N- und C-Termini. Während der Transport kationischer Aminosäuren in allen CAT-Isoformen Na⁺-unabhängig erfolgt, unterscheiden sich die zelluläre Expression und die Transportkapazitäten weitreichend (Closs and Graf 1999). Während der Transporter CAT-1 allgegenwärtig in Geweben und Zellen exprimiert ist, unterscheidet man CAT-2 in die beiden Spleißvarianten CAT-2A und CAT-2B, die sich lediglich in einem Abschnitt von 42 Aminosäuren unterscheiden (Closs et al. 1997). CAT-2A kommt in residenten Hepatozyten vor und wird daher als „Leber-Typ“-CAT bezeichnet und ist einer Reihe von Zellen induzierbar (Closs et al. 1997). CAT-2B kommt resident nur in glatten Muskelzellen vor und ist ebenso wie CAT-2A in einer Vielzahl anderer Zellen und Geweben induzierbar. Die Isoformen CAT-3 und CAT-4 werden beide im Gehirn exprimiert. CAT-3 scheint vor allem eine wichtige

Funktion während der Embryonalentwicklung zu besitzen, während über die Bedeutung im adulten Organismus und über die Induzierbarkeit wenig bekannt ist (Vekony et al. 2001). Der CAT-medierte L-Arginin Import aus dem Extrazellularraum stellt neben der L-Arginin Biosynthese einen wichtigen Mechanismus der zellulären L-Arginin Versorgung dar. Die physiologischen Konzentrationen im humanen Plasma liegen zwischen 20 und 200 μM L-Arginin (Morris, Jr. 2002). In Geweben ist die L-Arginin Konzentration in der Niere mit 15 nmol L-Arginin/mg Protein am höchsten, während in der Leber und im Herz nur 1 bzw. 3 nmol L-Arginin/mg Protein gefunden werden (Lortie et al. 2000). Zellkulturmedien beinhalten in der Regel L-Arginin Konzentrationen zwischen 0,4 und 1,2 mM, so dass diese Konzentrationen deutlich über den physiologischen Konzentrationen liegen und dieser Umstand beim Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Ergebnissen zu berücksichtigen ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die maximale iNOS-Aktivität in Makrophagen die Ko-Expression des induzierbaren Transporter CAT-2 erfordert (Nicholson et al. 2001), da die Expression des resident exprimierten CAT-1 eine nicht ausreichende L-Arginin Versorgung für eine maximale iNOS-Aktivität zur Folge hatte. Da sowohl die iNOS- als auch die CAT-2-Expression über proinflammatorische Zytokine induziert werden und die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an beiden Signalwegen belegt ist (Hammermann et al. 2000), scheint die simultane Induktion von CAT-2 der molekulare Mechanismus zu sein, welcher eine ausreichende Substratversorgung für eine maximale iNOS-Aktivität gewährleistet, während die L-Arginin Versorgung unter nicht-entzündlichen Bedingungen im wesentlichen durch die CAT-1 zu erfolgen scheint. Durch Untersuchungen an Ratten konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die LPS-induzierte iNOS-Expression nicht nur eine abnehmende L-Arginin Konzentrationen im Plasma zur Folge hat, sondern auch die Konzentrationen von anderen L-Arginin Metaboliten verändert (Lortie et al. 2000). Da auch in Wunden der Haut erniedrigte L-Arginin Konzentrationen gefunden wurden, scheint der CAT-medierte L-Arginin Transport in der Regulation des Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle zu spielen (Albina et al. 1990). Zunehmend in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesse rückt ein weiterer effizienter Mechanismus zur Regulation der iNOS-Aktivität. Die Expression von Arginasen, einer Enzymfamilie, welche L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin metabolisiert, bewirkt die Konkurrenz um das gemeinsame Substrat L-Arginin. Die Familie der Arginasen besteht aus

den beiden Isoformen Arginase-1 und Arginase-2, die eine hohe Homologie untereinander zeigen (59% Identität der Aminosäuresequenzen (Haraguchi et al. 1987)), jedoch bedeutende Unterschiede in der zellulären Expression und Funktionalität aufweisen. Die Arginase-2 ist ein mitochondrial lokalisiertes Enzym, welches in nahezu allen Zellen und Geweben exprimiert wird und eine Schlüsselstellung im Harnstoffzyklus einnimmt (Colleluori et al. 2001;Gotoh et al. 1997). Im Gegensatz dazu wird die Arginase-1 konstitutiv im Zytosol von Hepatozyten exprimiert und ist durch Th₂-Zytokine in einer Reihe von anderen Zelltypen induzierbar (Mori and Gotoh 2000). Es konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass vor allem die Expression der Arginase-1 eine regulatorische Funktion für die Modulation der iNOS-Aktivität besitzt. So wurde in Makrophagen durch die Induktion der Arginase eine Limitierung der iNOS-Aktivität gezeigt und die durch Arginase-1 modulierte, intrazelluläre Substrat-Depletion als Mechanismus der iNOS-Aktivitäts-Modulation vorgeschlagen (Morris, Jr. et al. 1998). Untersuchungen an Patienten mit septischen Schock (Bune et al. 1995) und in Wundheilungsprozessen (Shearer et al. 1997) zeigten eine *in vivo* Beteiligung dieses Mechanismus an pathophysiologischen Vorgängen.

1.4. Chemie des Stickstoffmonoxidradikals NO

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein anorganisches Gas, welches in wässrigen Lösungen bis zu einer Konzentration von 2 mM gut löslich ist. Daher sollte NO in biologischen Systemen, in denen die Konzentrationen maximal im μM Bereich liegen, nicht als Gas betrachtet werden. Als ungeladenes Molekül reagiert NO vorwiegend mit ungepaarten Elektronen, wie sie z.B. beim molekularen Sauerstoff oder bei Metall-Ionen vorkommen. Obwohl NO ein freies Radikal ist, kennzeichnet die Halbwertszeit von mehreren Sekunden seine relativ geringe Reaktivität (Moncada and Higgs 1991). Als lipophiles Molekül kann es frei durch Zellen diffundieren und Zellmembranen penetrieren. NO kann in Anwesenheit von Sauerstoff über höhere Stickoxide wie N_2O_3 oder N_2O_4 , zu seinen stabilen inaktiven Endprodukten Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) oxidiert werden. Die Produkte dieser Reaktionen sind die sogenannten „reaktiven Stickstoffoxid Intermediate“ (RNOI), welche eine Klasse von kurzlebigen, hochreaktiven Species darstellen und für ein breites Spektrum von Reaktionen mit biologischen

Makromolekülen verantwortlich sind. Im wesentlichen werden die verschiedenen chemischen Reaktionsmöglichkeiten des NO-Moleküls durch die lokalen Konzentrationen von NO und RNOI bestimmt. Die Reaktivität der verschiedenen Intermediate mit den unterschiedlichen Zielgruppen erklärt die pleiotropen Effekte von NO in biologischen Systemen (Stamler et al. 1992). So müssen klassische Signalmoleküle zuerst über ein Transportmolekül sezerniert werden um dann an einen Membran-gebundenen Rezeptor zu binden, im Gegensatz dazu kann durch die cNOS synthetisiertes NO frei diffundieren und diffusionskontrolliert an die Hämgruppe der löslichen Guanylat-Zyklase (sGC) binden und so für die Vermittlung der NO-medierten Blutdruckregulation sorgen. Aus der iNOS Aktivität aber resultieren für einen längeren Zeitraum hohe lokale NO-Konzentrationen und als Folge auch hohe Konzentrationen von RNOIs, welche sich für den „nitrosativen Stress“ verantwortlich sind. Diese komplexe Chemie (siehe Abb. 3) der Reaktion von NO bzw. RNOIs mit Sauerstoff spielt eine zentrale Rolle in der Redox-regulierten Aktivierung zellulärer Prozesse, der Transkription, Proliferation und Apoptose (Hausladen et al. 1996) (Kröncke et al. 2001).

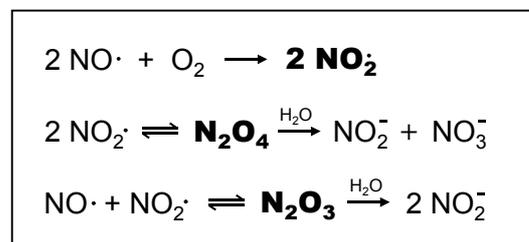


Abb.3: Reaktionsprodukte von NO mit molekularem Sauerstoff. Die verschiedenen chemischen Reaktionen hängen primär von der lokalen NO-Konzentration ab. Stabile Oxidationsprodukte sind Nitrit und Nitrat. Unstabile und hochreaktive Intermediate sind in dieser Abbildung fettgedruckt.

1.5. Molekulare Targets von NO

Die verschiedenen Intermediate und Reaktionsprodukte, die bei der Reaktion von NO bzw. RNOI mit Sauerstoff entstehen, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktivität mit molekularen Targets. Die NO-medierte Signaltransduktion wird in cGMP-abhängig bzw. cGMP-unabhängig unterschieden. Wie schon beschrieben, führt die Bindung von NO an die Häm Gruppe der sGC zu einer Enzymaktivierung und damit zu ansteigenden cGMP-Konzentrationen. Die cGMP-unabhängige Mechanismen führen z.B. zur Zerstörung von Metal-Schwefel Clustern, DNA-Schäden, Proteinmodifikationen durch S-Nitrosierung von Thiolgruppen. Abbildung 4 zeigt schematisch die bisher bekannten zellulären Targets von NO.

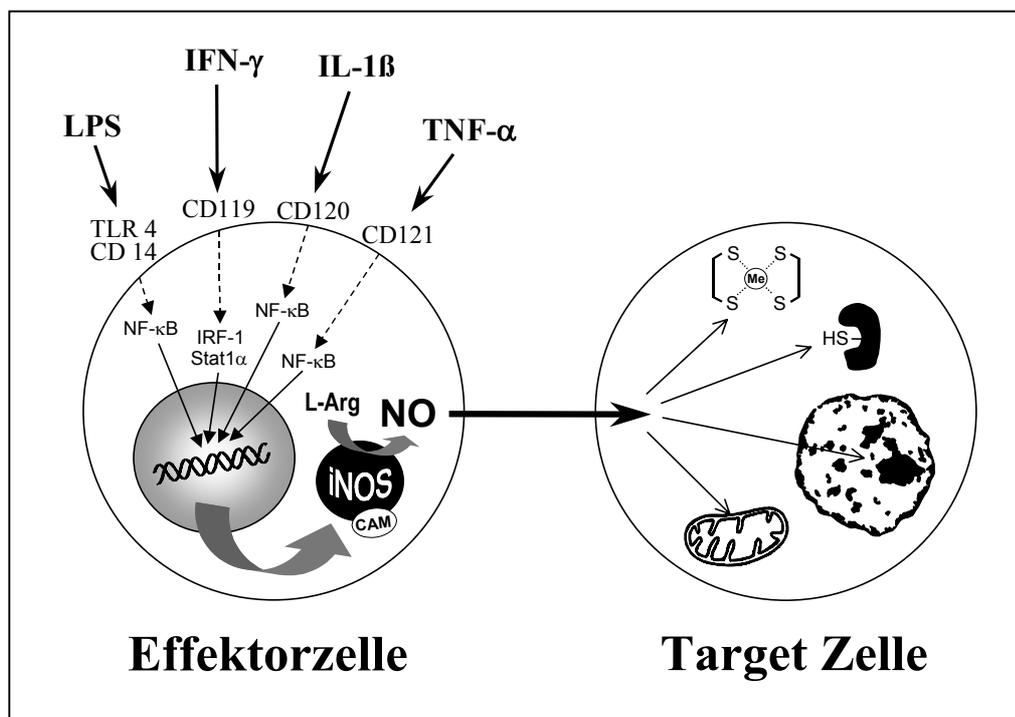


Abb. 4: Signalwege der iNOS Induktion und zelluläre Targets von NO. Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) können an der Zelloberfläche an spezifische Rezeptoren binden und zur Aktivierung einer Signalkaskade führen, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren im Zytosol aktiviert. Diese Transkriptionsfaktoren werden in den Zellkern transloziert, binden an entsprechende Konsensus-Sequenz des Promotors bzw. der Enhancer Region des iNOS Gens. Anschließend starten Transkription und iNOS Proteinsynthese. Das synthetisierte NO kann als lipophiles Molekül in die benachbarte Targetzelle diffundieren und dort nitrosativen Stress auslösen. Die dominanten molekularen Targets des NO sind Häm Motive, Proteine mit Metal-Schwefel Clustern oder Thiolgruppen. Bei den Organellen stellen Mitochondrien und Nukleus bevorzugte Targets dar, wobei berücksichtigt werden muss, das NO mit mehreren Targets gleichzeitig reagieren kann. (Kröncke et al. 2000)

Der Nukleus ist ein bevorzugtes zelluläres Target für NO. Durch die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase (Lepoivre et al. 1991) wird die DNA-Synthese und DNA-Reparatur gehemmt. Reaktive Stickstoffoxid Intermediate können direkte mutagene Effekte durch G:C – A:T Transitionen und DNA-Strangbrüche verursachen. Beide Effekte sind beschrieben als Folge von N-Nitrosylierungen primärer Amine von DNA-Basen (Tannenbaum et al. 1994). Die NO-induzierten DNA-Strangbrüche führen zur Aktivierung der nukleär konstitutiv exprimierten Poly (ADP)-Ribose Polymerase (PARP), wodurch das Tumor-Suppressor Protein p53 in den Kern transloziert wird und den Zellzyklus-Arrest zur Durchführung der DNA-Reparatur auslöst (Enoch and Norbury 1995). Das Ausmaß der DNA-Schäden entscheidet über das Überleben der Zelle und die Durchführung von Reparaturmechanismen oder den Zelltod mittels Apoptose. Die Aktivierung von Caspasen (Cystein-Proteasen) und eine nachgeschaltete Reaktionskaskade führt zur Spaltung und Inaktivierung der PARP und mündet in den apoptotischen Zelltod (Cohen 1997). Im Gegensatz dazu führt die Automodifizierung der PARP durch Bindung von bis zu 200 ADP-Resten zur DNA-Reparatur. Die Inhibition der PARP löst die Dissoziation von der DNA aus und Glykohydrolasen bauen die ADP-Ribose Polymere ab, so dass die DNA-Reparatur-Enzyme ihre Aufgabe an den wieder zugänglich gewordenen DNA-Abschnitten ausüben können. Der gesamte Prozess erfordert ein enormes Energie- und Substratreservoir, so dass die zellulären Reserven von ATP und NAD^+ schnell erschöpft und die Zellen in die Nekrose übergehen können (Kröncke et al. 1997). Zusätzlich konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass NO das DNA-Reparatur Enzym Fapy-DNA Glycosylase inhibiert (Wink and Laval 1994).

Hauptreaktionspartner von NO in Proteinen sind SH-Gruppen. Die reversible Reaktion von NO/RNOI mit Cysteinresten führt neben der Bildung von Nitrosothiolen zur temporären Hemmung der Proteinaktivität, da funktionelle SH Gruppen verändert und zusätzlich komplexierte Metallionen wie z.B. Fe^{2+} aus katalytisch aktiven Zentren verdrängt werden (Coleman 1992), die von essentieller Bedeutung für die Enzymaktivität sind. So wurde in einer Reihe von Enzymen, wie z.B. der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) und der Succinat-Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II) der mitochondrialen Elektronentransportkette gezeigt, dass NO Eisen freisetzt und die Enzymaktivität inhibiert (Henry et al. 1993). Mechanistisch erfolgt die Bildung von Eisen-Nitrosyl-Komplexen und führt

zur Inaktivierung von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen prosthetischen Gruppen in Häm- und nicht-Häm Proteinen (Pellat et al. 1990). Zink-Schwefel (Zn-S) Cluster hingegen fungieren häufig als Strukturelemente. In Zinkfingern-Motiven sind Zn^{2+} über Gruppen von Cysteinresten und/oder N-Imidazol Stickstoffe von Histidin komplexiert und sorgen für eine ideale Ausrichtung der Aminosäure-Reste bei der DNA- oder RNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NO unter aeroben Bedingungen diese Zn-S Cluster durch S-Nitrosierung zerstört und eine Protein-gebundene Zink²⁺-Freisetzung in der Zelle zur Folge hatte (Berendji et al. 1997;Kroncke et al. 1994). Die Zerstörung von Zinkfingern in Transkriptionsfaktoren hat eine stark verminderte DNA-Bindungsaktivität zur Folge. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass durch RNOI zerstörte Zinkfinger, im Gegensatz zu irreversiblen ROI induzierten Schäden, in einem hohen Maß reversibel sind. Daraus kann eine Sonderstellung des NO unter diesen reaktiven Species abgeleitet werden, da NO als einziges der untersuchten Moleküle dieser Klasse durch die Reversibilität der Reaktion auch über ein regulatorisches Potential im Bezug auf die Genexpression verfügt (Kroncke et al. 2002). S-Nitrosierungen von Cystein-Resten sind häufig auftretende NO-medierte Proteinmodifikationen (Stamler and Hausladen 1998). So sind eine Reihe von Enzymen bekannt, deren katalytische Zentren reduzierte SH-Gruppen beinhalten, die nach erfolgter S-Nitrosierung, auch ohne das Vorhandensein komplexierter Metalle, einen temporären Funktionsverlust des Proteins zur Folge haben (Becker et al. 1998;Stamler 1994). Aber auch die Aktivierung von Proteinen mittels S-Nitrosierung wurde gefunden, so z.B. beim kleinen GTP-bindenden Protein p21^{ras} (Lander et al. 1995). Am bakteriellen Transkriptionsfaktor OxyR konnte eine NO-vermittelte Induktion der Transkription von antioxidativ wirksamen Enzymen gezeigt werden (Hausladen et al. 1996). In den vergangenen Jahren wurden eine Vielzahl von Evidenzen publiziert die belegen, dass NO selbst nicht nur viele protektive Eigenschaften zum Schutz der Zelle ausüben kann, sondern seine wesentliche Funktion in der Regulation zellulärer Prozesse wie Genexpression, Proliferation und Differenzierung liegt. NO kann als Antioxidans fungieren und die Zelle sehr effektiv vor ROI induzierter Lipidperoxidation schützen (Schafer et al. 2002). In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass NO die Zellen vor UV-induzierter Apoptose über den einen Anstieg der Bcl-2 Expression, einem anti-apoptotisch wirksamen Protein, schützen kann

(Suschek et al. 1999). In einer jüngst erscheinende Veröffentlichung konnte durch DNA-Mikroarray Studien gezeigt werden, dass über 200 Gene in ihrer Expression durch NO moduliert werden (Zamora et al. 2002). Die Analyse der modulierten Gene und die Klassifizierung nach Genfamilien veranlasste die Autoren zur Hypothese, dass die iNOS-Expression in Ratten-Hepatozyten generell eine anti-inflammatorische und anti-apoptotische Rolle übernimmt. Gleichsam bedeutend wie für die Genregulation ist NO in der Steuerung der Immunantwort. Durch Untersuchungen in iNOS-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass deren Th₁-Immunantwort wesentlich stärker ausfällt als die in den Wildtyp-Tieren (Wei et al. 1995). Somit zeigt NO ein hohes Potential, inflammatorische Prozesse zu regulieren und ein wichtiger Modulator der Th₁-Th₂ Balance Immun-medierter Erkrankungen zu sein (Kolb-Bachofen et al. 2000). In Übereinstimmung mit der Schlüsselrolle von NO in Immunreaktionen steht die Erkenntnis, dass neben der eNOS auch die iNOS Expression in dermalen Endothelzellen bei Entzündungen eine zentrale Funktion in der Regulation des inflammatorischen Geschehen einnimmt, wobei die vollständige Funktion der iNOS heute noch nicht in allen Details verstanden ist. Im Verlauf einer Entzündung werden vaskuläre Endothelzellen durch die Sezernierung von Zytokinen durch Makrophagen und Lymphozyten aktiviert, wodurch die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (VCAM, ICAM 1-3) (Bevilacqua et al. 1991) erfolgt. Diese Adhäsionsmoleküle binden spezifisch an Erkennungssequenzen an der Oberfläche von Monozyten oder Lymphozyten. Durch eine schwache, reversible Bindung der Leukozyten über Selektine an die Endothelzellen wird die Geschwindigkeit im Blutstrom verlangsamt („Rolling“) und die Immunzellen können durch das Endothel aus dem Blutstrom austreten und sich am inflammatorischen Geschehen beteiligen (Butcher 1991). Die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wird durch die NOS-Aktivität moduliert, wobei die Inhibition der NOS die Adhäsion und Emigration von Leukozyten und Entzündungsprozesse begünstigt (Kolb-Bachofen et al. 2000; Nussler et al. 1993). Ein identischer Befund konnte auch in iNOS-Knockout Mäusen nach LPS Aktivierung gezeigt werden (Hickey et al. 1997), wodurch die regulatorische Funktion sowohl von eNOS synthetisiertem als auch iNOS synthetisiertem NO an der „Bindung“ von Leukozyten in entzündlichen Prozessen belegt wird.

1.6 Bedeutung von NO für die Homöostase der Haut und bei Hauterkrankungen

Durch seine vielfältigen biologischen Aktivitäten, die Vielzahl seiner Reaktionsmöglichkeiten und seiner besonderen chemischen Struktur ist NO in nahezu allen Organsystemen als ein bedeutender biologischer Modulator physiologischer und pathophysiologischer Prozesse identifiziert worden. Die Aufklärung von NO-medierten Signalwegen in verschiedenen Hautzellen (Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten und dermale Endothelzellen) rückten das Molekül NO nicht nur im Bezug auf die Homöostase der Haut, sondern auch im Rahmen pathophysiologischer und immunologischer Prozesse der Haut in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die molekulare Charakterisierung der NO-Synthese gewährte substanzielle Einsichten in der Bedeutung von NO für Entzündungsprozesse, Hyperproliferation und Auto-Immunerkrankungen der Haut sowie für den Hautkrebs (Bruch-Gerharz et al. 1998). Der Aufbau humaner Haut ist schematisch in Abb. 5 A gezeigt.

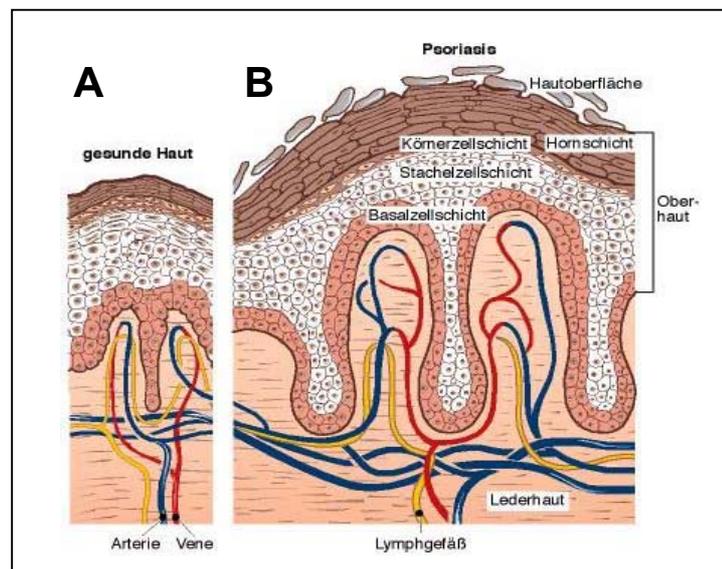


Abb. 5: Schematischer Vergleich gesunder und psoriatischer Haut. Die Epidermis („Oberhaut“) gesunde Haut (A) besteht aus wenigen Zellschichten Keratinozyten und ist durch die Basalschicht von der tiefer liegenden Dermis („Lederhaut“), die zum überwiegenden Teil aus Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen besteht, getrennt. Im Gegensatz dazu ist die Epidermis psoriatischer Haut (B) durch charakteristische zapfenförmige Ausstülpungen verbreitert und an der Haut-Oberfläche psoriatischer Plaques schuppen sich abgestorbene Zellen ab. (aus: „Health on the net“ nach Prof. Dr. Korting)

Die Epidermis ist eine dynamische, sich permanent erneuernde Struktur, welche den Organismus von seiner Umwelt abgrenzt. Der Hauptzelltyp der Epidermis sind Keratinozyten, welche einem komplexen und zeitlich koordinierten

Differenzierungsprogramm unterliegen (Eckert et al. 1997). Unter physiologischen Gesichtspunkten ist die Homöostase von Geweben durch ein Gleichgewicht von Zellproliferation und Zelltod charakterisiert. Während die Arretierung der Zellteilung ein Erfordernis für den Übergang in die terminale Differenzierung darstellt, wird die Mitogenese durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren beeinflusst. Veränderungen dieser Prozesse sind bedeutend für die Pathogenese von Hauterkrankungen. So konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden, dass die Reaktionskaskaden, die die Proliferation und Differenzierung humaner Zellen regulieren, durch NO entscheidend moduliert werden (Ignarro et al. 2001;Krischel et al. 1998). Die Induktion der iNOS repräsentiert einen wichtigen Schritt in der Arretierung der Zellproliferation und initiiert die terminale Differenzierung z.B. in neuronalen Zellen (Peunova and Enikolopov 1995). Die konstitutive Expression der iNOS in Keratinozyten psoriatischer Hautläsionen belegt die Bedeutung von NO für Proliferation und Differenzierung in der Haut. In der Psoriasis, die durch eine Hyperproliferation der epidermalen Keratinozyten (Bruch-Gerharz et al. 1996) charakterisiert ist, wird die iNOS Expression als Gegenmechanismus zur exzessiven Mitogenese psoriatischer Keratinozyten diskutiert (Bruch-Gerharz et al. 1998). Dem NO wird hierbei die Rolle als negativer Regulator des Zellwachstums entweder durch Inhibition der Proliferation oder Induktion der terminalen Zelldifferenzierung zugeschrieben. Basierend auf diesen Ergebnissen führt die iNOS Expression in psoriatischen Läsionen zu einem „iNOS/Psoriasis-Paradoxon“: NO hemmt die Proliferation und induziert die Differenzierung. Doch in der Psoriasis führt die „konstitutive“ iNOS-Expression in den Keratinozyten, verbunden mit potentiell hohen NO-Konzentrationen, zu keinem antiproliferativen Effekt, sondern im Gegenteil, sie ist von einer Hyperproliferation der epidermalen Keratinozyten gekennzeichnet. Neben Cortikoiden, die immun-suppressiv wirksam sind und bei schweren Krankheitsverläufen eingesetzt werden, hat sich zur Behandlung der Psoriasis die PUVA-Therapie, eine Kombination von UV-A Strahlung und dem lichtsensibilisierenden Wirkstoff Psoralen bewährt (Parrish 1981). Psoralen ermöglicht durch die Erhöhung der Lichtempfindlichkeit der Haut, die Verwendung geringerer UV-A Bestrahlungsintensitäten, die bei systemischer Psoralengabe im Durchschnitt bei 130 J/cm^2 liegt (Diette et al. 1984). Da die minimale Erythemdosis für UV-A ohne Psoralen mit $50\text{-}100 \text{ J/cm}^2$ angegeben wird (Sakuntabhai et al.

1994), kann die hohe Strahlungsbelastung der PUVA-Therapie zu phototoxischen Effekten führen. Die molekularen Wirkmechanismen der kutanen Phototherapie sind nur ansatzweise bekannt, wobei 2 Reaktionstypen zu unterscheiden sind. Typ 1 repräsentiert die zelluläre Ebene mit der Photoadduktion des Psoralen an die DNA. Die antiproliferativen Effekte entstehen durch die Inhibition der DNA-Replikation sowie der Reduktion der ribosomalen Aktivität (Chandra 1972). Typ 2 ist eine Sauerstoff-abhängige Reaktion, bei der freie Radikale entstehen, wodurch die Transkription der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-8 inhibiert wird (Neuner et al. 1994)).

Störungen der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion können zur Aufhebung der Hautintegrität führen. Durch Untersuchungen in Fibroblasten, konnten veränderte NO-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf der Wundheilung gezeigt werden (Lee et al. 2001). Die Modulation der NO-Synthese könnte der Abfolge von Entzündungen in der frühen Phase des Wundheilungsgeschehen gefolgt von Proliferation und Erneuerung des Gewebe in einer späteren Phase (tissue remodelling) angepasst sein (Wang et al. 1997). In iNOS-Knockout Mäusen wurden zeitlich signifikante Verlängerungen des Wundheilungsprozesses gezeigt, was ein Beleg für eine positive Beteiligung von NO bei der Wundheilung darstellt (Yamasaki et al. 1998). In Übereinstimmung mit diesem Befund, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl topisch applizierte NO-Donoren als auch die Supplementation mit L-Arginin zu einer verbesserten Wundheilung führen (Kirk et al. 1993). (Efron and Barbul 1999;Pulfer et al. 1997)Der gut charakterisierten iNOS Expression in Keratinozyten und Langerhans Zellen wird enorme Bedeutung für die Regulation immunologischer und entzündlicher Reaktionen der Haut beigemessen, denn NO zeigt starke Effekte auf eine erfolgte Immunantwort (Kolb-Bachofen and Bruch-Gerharz 1999;Kolb and Kolb-Bachofen 1998).

Zusammenfassend weisen die bisherigen Erkenntnisse dem NO Radikal eine bedeutende Aufgabe in der Regulation zellulärer Antworten in Prozessen der angeborenen Immunität sowie in Entzündungen zu und implizieren die Bedeutung von NO für die Pathogenese entzündlicher und Immun-mediierter Hauterkrankungen.

1.7. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die entzündliche, hyperproliferative Hauterkrankung Psoriasis ist durch eine „konstitutive“ iNOS Expression in den Keratinozyten und einer charakteristischen Hyperproliferation dieses Zelltyps gekennzeichnet. Ziel der Arbeit war es eine Erklärung für dieses „iNOS/Psoriasis-Paradoxon“ zu finden, denn die iNOS-Expression ist assoziiert mit potentiell hohen lokalen NO-Konzentrationen und anti-proliferativen Eigenschaften von NO, doch in psoriatischer Haut wird tatsächlich genau das Gegenteil beobachtet. Dazu sollte insbesondere die Rolle der Substratverfügbarkeit und der Substrat-Transport als mögliche Parameter einer limitierten NO-Synthese *in vivo* untersucht werden.

Obwohl die Bedeutung der Expression und Aktivität von NO-Synthasen für eine Vielzahl zellulärer Prozesse in der Haut bekannt ist, lagen zu Beginn dieser Arbeit nahezu keine Erkenntnisse über den Transport des NOS-Substrats L-Arginin und die Bedeutung der Verfügbarkeit für die Regulation der iNOS-Aktivität vor.

Die bei der Beantwortung dieser Fragen gewonnen Erkenntnisse sollten wichtige Erkenntnisse für die Regulation der iNOS-Aktivität aufzeigen und damit bestehende Lücken in unserem Verständnis zur Bedeutung des L-Arginin Metabolismus im Rahmen entzündlicher Prozesse schließen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben stammten die verwendeten Chemikalien von Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

Agarose; DEPC: Diethylpyrocarbonat; DMSO: Dimethylsulfoxid; EDTA: Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat; Eukitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland); Hematoxylin; Hoechst 33342 ((2'-[Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidodazol)); Kollagenase (Serva, Heidelberg, Deutschland); 2-Mercaptoethanol; L-Arginin; L-Glycin; L-Ornithin; L-Lysin; L-Valin; NIO: L-N-(-Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid (Alexis, Grünberg, Deutschland); Phenol (Roth); Propidiumiodid; RNAsin: RNase-Inhibitor (Promega); Tris-HCl: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid; Trypanblau (Gibco, Eggerstein, Deutschland); Trypsin (Serva)

2.1.2. Zytokine und Enzyme

IL-1 β : rekombinantes Interleukin-1 β ; IL-4; IL-10; IL-13; IFN- γ : rekombinantes humanes γ -Interferon; TNF- α : rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor (alle Strathmann Biotec, Hamburg); Taq-Polymerase und reverse Transkriptase (Qiagen, Hilden, Deutschland); Restriktionsenzyme EcoR1, BamH1, Not1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.3. Antikörper

Polyklonaler Maus-anti-iNOS Antikörper (Transduction, Lexington, USA)	50 ng/ml
Polyklonaler Maus-anti-Arginase-1 Antikörper (Transduktion)	200ng/ml
Polyklonale Kaninchen-anti-Arginase-1 Antiseren (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Pfeilschifter, Universität Frankfurt, Institut für Pharmakologie)	100ng/ml
Polyklonale Kaninchen-anti-Arginase-2 Antiseren (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Pfeilschifter)	100ng/ml
Monoklonaler Maus-anti-MSP Antikörper (R&D Systems, Europe, Abingdon, Großbritannien)	50 μ g/ml
Monoklonaler Maus-anti-RON Antikörper (R&D Systems)	50 μ g/ml
Polyklonaler Kaninchen-anti-S-Nitrosocystein Antikörper (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)	100ng/ml

2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM: Dulbeccos minimal essentiell medium (Gibco); FCS: Fetal calf serum (High-Quality) (PAA Laboratories, Linz, Österreich); KGM-2: Keratinocyte Growth Medium (BioWhittaker); Genitacin G418; Glutamax: (L-Alanyl-Glutamin) 100-fach (PAA); HEPES (Gibco); Pen-Strep: Penicillin-Streptomycin (Gibco); Standart RPMI 1640 (Gibco); Ca-Nitrat und L-Arginin freies RPMI 1640 (BioWhittaker Europa)

2.1.5. Verwendung von NO-Donoren

Die NO-Donoren DETA/NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-moniummethyl)amino] diazen-1-ium-1,2diolat) und SNAP (S-Nitrosothiol-N-Acetylpenicillamin) haben bei 37 °C in Zellkulturmedium eine Halbwertszeit von ca. 8 Stunden bzw. ca. 4-5 Stunden. Es wurden 50 mM Stocklösungen unmittelbar vor der jeweiligen Verwendung auf Eis hergestellt und diese mit Zellkulturmedium auf die Endkonzentrationen von 10 –1000 µM verdünnt. Zur Kontrolle wurden die denitrosilierten Komponenten DETA/NO_{-NO} und SNAP_{-NO} (5-8 Tage bei 37 °C abreagierte Stocklösungen) in der jeweilig höchsten eingesetzten Konzentration verwendet. Die verwendeten NO-Donoren wurden freundlicherweise von PD Dr. Klaus Kröncke, (Forschungsgruppe Immunbiologie der HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

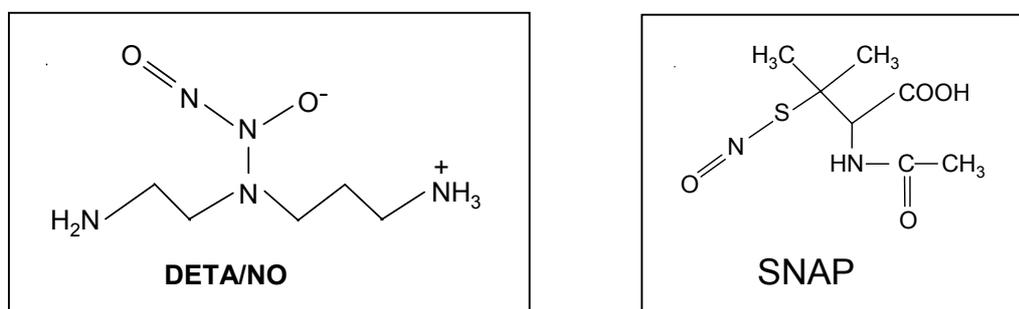


Abb. 6. Chemische Strukturformeln der NO-Donoren DETA/NO und SNAP

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturen und Kurzzeit-Organokulturen

Primäre humane Keratinozyten wurden aus normaler Haut, die bei plastischen Operationen (Florence Nightingale Krankenhaus Kaiserswerth, Abteilung für Plastische Chirurgie) anfällt, isoliert. Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Haut in PBS überführt. Das Gewebe wurde gewaschen, in Stücke von ca. 0,5 cm² geteilt und in Dispase-Lösung (Dispase II, Boehringer, Ingelheim, Deutschland) überführt. Nach 12-stündiger Inkubation wurde die epidermale Schicht der human Keratinozyten vorsichtig von der Dermis getrennt und in Zentrifugenröhrchen mit Trypsin-EDTA (Gibco) überführt. Das Gewebe wurde 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit einer Pipette mehrfach aufgezogen, um die Zellen zu dissoziieren. Nach dieser Behandlung wurde die Enzymaktivität durch Zugabe eines Trypsin-Inhibitors gestoppt und für 10 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und mit einer Dichte von 3x10⁶ Zellen pro Zellkulturschale ausgesät. Bei 37 °C lang und 5%-CO₂ Begasung wurde diese Einzelzell-Suspension bis zur Adhärenz der Zellen inkubiert und nach Erreichen einer 75%-igen Konfluenz passagiert. Die Zellen wurde in KGM-2 Medium (BioWhitaker Europa, Taufkirchen, Deutschland) kultiviert. Bei Untersuchungen zu den Effekten von proinflammatorischen Zytokinen bzw. NO-vermittelten Effekten wurden die Zellen für 5 Tage in Abwesenheit von Hydrocortison kultiviert.

Kurzzeit-Organokulturen wurden aus normaler Haut aus plastischen Operationen präpariert. Das Gewebe wurde dazu mit PBS gewaschen, in ca. 0,5 cm² Stücke geteilt und in RPMI mit 10% FCS bei 37 °C und 5%-CO₂ Begasung für 8-24 Stunden kultiviert.

Humane Fibroblasten wurde aus normaler Haut isoliert. Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Haut direkt in PBS überführt. Das Gewebe wurde gewaschen und in ca. 0,5 cm² große Stücke geteilt und in RPMI für 7 Tage kultiviert. Die aus dem Gewebe ausgewachsenen Fibroblasten wurden als adhärenente Zellen bis zur 12. Passage für Experimente eingesetzt werden.

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HUDEC) wurden von PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen und in Endothelium Growth Medium (Gibco) mit den Supplementen Hydrocortison, EGF und ECGF bis zur 8. Passage kultiviert.

Die immortalisierten Zelllinien HaCat (Keratinocyten Zelllinie) und HepG2 (Hepathocyten Zelllinie) wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen und in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. Zur Bestimmung der NOS-Aktivität wurde die Zellen in einem RPMI-Spezialmedium kultiviert, welches weder Ca-Nitrat noch L-Arginin enthält und nur mit 2% FCS sowie definierten L-Arginin Konzentrationen supplementiert wurde.

Die mit einem 16 kb Fragment der 5'-Region des iNOS Gens stabil transfizierte humane Lungenepithelzelllinie A549/8 sowie die DLD-Zellen wurden von PD Dr. Kleinert (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mittels einer Geneticin G418 Resistenz. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI mit 10% FCS und 1 mg/ml Geneticin G418.

2.2.2. Zytokinaktivierung

Zur Untersuchung der Effekte von Zytokinen und Stickstoffmonoxid auf Zellen oder Hautgewebe wurden einzelne Zytokine oder Kombinationen von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (je 100 - 1000 U) verwendet. Zur Induktion der iNOS wurde ein Mix dieser drei Zytokine (100-1000 U) verwendet. Die Analyse der iNOS-Promotoraktivität wurde mit einzelnen Zytokinen sowie Kombinationen im Konzentrationsbereich zwischen 100-1000 U durchgeführt. Die Untersuchungen der Effekte von Makrophagen-stimulierendem Protein (MSP) auf die iNOS-Expression und Proliferation von Zellen wurden mit Konzentrationen zwischen 10-200 ng/ml durchgeführt.

2.2.3. UV-A Bestrahlung

Zur Untersuchung der Effekte von UV-A auf die Genexpression relevanter Proteine wurden Zellen oder Gewebe mit nicht-toxischen Dosen zwischen 5 und 25 J/cm² in PBS bestrahlt. Das Auftreten einer UV-A induzierten Apoptose wurde in Keratinozyten und Kurzzeitorgankulturen erst bei Dosen größer als 30 J/cm² beobachtet. Als UV-A Quelle wurde eine Sellas-4000 Lampe (Sellas Medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland) verwendet, die ein UV-A₁-Spektrum von 340-390 nm emittiert. Zur Bestimmung der Bestrahlungsdosis wurde die Strahlungsintensität vor jedem einzelnen Versuchen mittels UV-A Detektor gemessen.

2.2.4. Bestimmung der NOS-Aktivität mittels Griess-Test

Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit von 3-5x10⁵ Zellen in 6-well-Zellkulturschalen wurde die Nitritkonzentration in den Kulturüberständen als Maß für die NOS-Aktivität mittels Diazotierungs-Reaktion (modifiziert nach Wood et. al. 1990) colorimetrisch bestimmt. 100 µl Kulturüberstand wurden mit 50 µl Griess Reagenz I (1% Sulfanilamid in 2,5% Phosphorsäure) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Griess II Reagenz (1% N-1-Naphthylethylendiamin-dihydrochlorid in 2,5% Phosphorsäure) hinzugegeben und mit 20 µl Methanol zur Vermeidung von Blasenbildung überschichtet. Die Extinktion des Farbumschlags wurde mittels ELISA-Reader (Titertek Multiplan plus, Flow Laboratories, Heidelberg, Deutschland) bei 540 nm quantifiziert, wobei eine Konzentrationsreihe mit Natriumnitrit als Standard diente und die Extinktion des Mediums als Referenz von den Messwerten subtrahiert wurde. Als NOS-Inhibitor wurden 250 µM L-N(5)-(1-imino-ethyl)ornithine (NIO) verwendet.

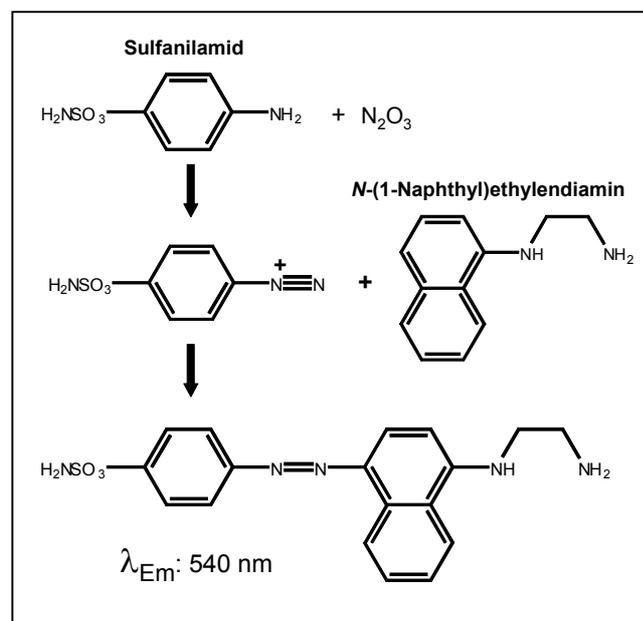


Abb. 7. Reaktionsgleichung der Griess-Reaktion

2.2.5. Bestimmung der NOS-Aktivität mittels 2,3-Diaminonaphtalen

Die Bestimmung geringer Nitritkonzentrationen wurde mittels eines fluorometrischen Tests (Alexis) durchgeführt. Die Reaktion des in den Kulturüberständen gebildeten Nitrit sowie des zu Nitrit oxidierten Nitrat, mit 2,3-Diaminonaphtalen führt bei saurem pH zur Bildung von 1(H)-Naphthotriazol, welches nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 365 nm Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 415 nm emittiert. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit von 3×10^5 Zellen in 6-well-Zellkulturschalen wurde die Nitritkonzentration in den Kulturüberständen als Maß für die NOS-Aktivität mittels 2,3-Diaminonaphtalen fluorometrisch bestimmt. 20 μ l Kulturüberstand wurden mit Puffer auf ein Volumen von 80 μ l eingestellt. Nach der Zugabe von jeweils 10 μ l Nitrat-Reduktase und Enzym-kofaktoren wurden die Proben auf einer schwarzen 96-well Zellkulturschale für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l DAN-Reagenz hinzugegeben, die Lösung 10 min lang inkubiert und die Reaktion mit 20 μ l NaOH (2N) gestoppt. Die Fluoreszenz der Proben wurden in einem Fluorometer (Fluorostar, BMG, Offenburg, Deutschland) mit einer geeigneten Filterkombination Excitation: 365 nm / Emission: 450 nm) bestimmt. Eine Konzentrationsreihe mit Natriumnitrit diente als Standard und die Fluoreszenz des Mediums wurde als Referenz von den Messwerten subtrahiert.

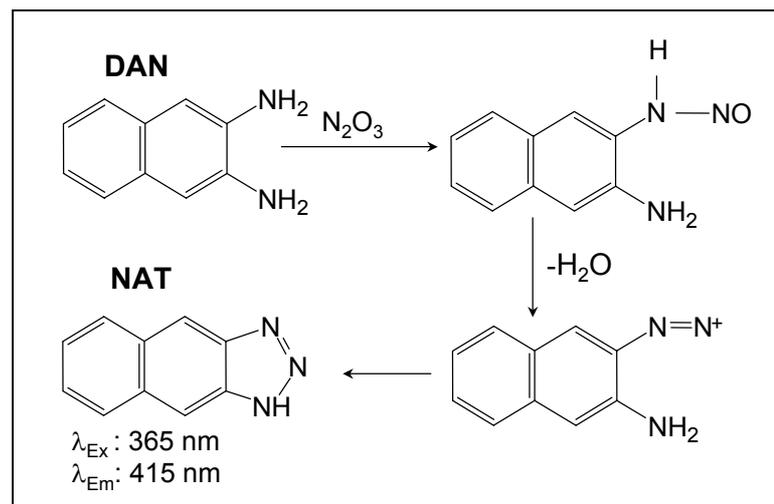


Abb. 8. Reaktionsgleichung der Reaktion von Diaminonaphtalen zu Naphthotriazol

2.2.6. Bestimmung der Arginaseaktivität mittels Harnstoffassay

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 Indophenol, wurde in einem ELISA-Reader bei 540 nm quantifiziert. Als Standard wurde eine Konzentrationsreihe einer Harnstofflösung verwendet. Der Test wurde so modifiziert, dass mit 20 μ l Kulturüberstand gearbeitet werden konnte.

2.2.7. Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven

Zellzahlbestimmungen und Wachstumskurven wurden mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot durchgeführt. Die Zellen wurden für 60 Minuten im Dunkeln mit einer 1:100 Verdünnung einer 3%-Lösung inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen, getrocknet und mit Isopropanol, welchem 1% HCl zugesetzt wurde, lysiert. Die Extinktion der Überstände, welche eine lineare Korrelation mit der Zellzahl aufweist, wurde im ELISA-Reader bei 530 nm bestimmt.

2.2.8. Bestimmung lebender Zellen mittels Trypanblau-Exklusionstest

Zur Quantifizierung lebender Zellen nach Zytokinaktivierung, UV-A- oder NO-Donor-Behandlung wurde ein Farbttest mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit dem Farbstoff inkubiert und die gefärbten Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, zeigt das Zytoplasma toter Zellen eine intensive Blaufärbung. Der Anteil toter Zellen wird in % angegeben bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

2.2.9. Quantifizierung der Zellen mit Chromatinkondensation und Zellkernfragmentierung

2-48 Stunden nach UV-A Bestrahlung, Zytokinaktivierung oder NO-Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem DNA-Farbstoff H33342 (4 µg/ml) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz der Zellkerne wurde mittels eines Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Extinktion: 355 nm, Emission 465 nm) gemessen. Zur Auswertung wurden mindestens 400 Zellen gezählt und die Auswertung erfolgte als %-Angabe der kondensierten oder fragmentierten Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

2.2.10. Quantifizierung nekrotischer Zellen

Die Quantifizierung nekrotischer Zellen wurde durch den Einbau des roten DNA-Farbstoffs Propidium Iodid (PI) durchgeführt. PI-positive Zellen wurden mittels eines Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Extinktion: 520 nm, Emission 610 nm) bestimmt. Zur Auswertung wurden mindestens 400 Zellen gezählt und die Auswertung erfolgte als %-Angabe der nekrotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

2.2.11. Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels *in situ* nick Translationen

Zum Nachweis von UV-A induzierter Apoptose wurden *in situ*-nick Translationen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode werden DNA-Einzelstrangbrüche *in situ* nachgewiesen. Die Zellen wurden nach der Behandlung für 10 Minuten luftgetrocknet, 10 Minuten in Aceton fixiert und anschließend in einem Gemisch aus Methanol und Wasserstoffperoxid für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität irreversibel zu hemmen. Die Reaktion der Polymerase erfolgt durch Inkubation für 10 Minuten in einem NT-Ansatz (3 μ M Biotin-dUTP, 5 U DNA-Polymerase, 3 μ M dGTP, 3 μ M dATP, 3 μ M dCTP, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, und 0.1 mM Dithithreitol) wie vom Hersteller (Boehringer Mannheim) angegeben. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen zum Nachweis des markierten Nukleotids mit Avidin-gekoppelter Peroxidase inkubiert. Die Zellen mit den DNA-Strangbrüchen konnten durch eine Farbreaktion mit Diaminobenzidin lichtmikroskopisch detektiert werden.

2.2.12. Immunhistochemische Untersuchungen

Gefrierschnitte psoriatischer und gesunder Haut wurden luftgetrocknet, 10 Minuten bei Raumtemperatur in Glutaraldehyd fixiert und 30 Minuten in Blockingpuffer (10% FCS in PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS, wurden die Schnitte zur Inhibition von endogener Peroxidaseaktivität für 20 Minuten in einer 0,3%-igen H₂O₂ Lösung in Methanol inkubiert und in PBS gewaschen. Die Reaktion mit den primären Antikörpern erfolgte dann bei 4°C für 60 Minuten. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte für 60 Minuten bei 4°C mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper inkubiert, zweimal gewaschen und für 45 Minuten mit ABC-Komplexlösung wie vom Hersteller (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) angegeben überschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde eine Enzym-vermittelte Farbreaktion mit Diaminbenzidin als Chromogen (Braunfärbung) durchgeführt. Nachdem die Schnitte über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol dehydriert wurden, erfolgte durch Hämatoxylin und Eosin eine Gegenfärbung, bevor die Schnitte mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) eingedeckt wurden. Zur Sicherung der Spezifität der Immunreaktion wurden sowohl eine Positiv- als auch Negativkontrolle für die Untersuchungen mitgeführt. Als Positivkontrollen wurden Hautschnitte mit bereits nachgewiesener Immunreaktivität für das jeweilige Antigen verwendet. Als Negativkontrollen wurden Vergleichsschnitte mitgeführt, bei denen ein irrelevanter monoklonaler Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse verwendet wurde. Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Zeiss-Mikroskop Axiovert 200.

2.2.13. Immunocytochemische Untersuchungen

Pro well wurden 2-4 x 10⁴ Zellen auf 2er Glas Chamber-Slides ausgesät, für 8 - 48 Stunden unter Zellkulturbedingungen kultiviert und mit verschiedenen exogenen Stimuli behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen unter einem kalten Luftstrom getrocknet, 10 min in Aceton fixiert und in PBS gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der verwendeten Primär-

Antikörper wurden die Proben zuerst 60 min in Blocking-Puffer und anschließend mit einem relevanten Primär-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (siehe verwendete Antikörper) in 0,25 % BSA/PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Objekträger in PBS gewaschen wurden, erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach der Durchführung eines weiteren Waschvorgangs erfolgte die Inkubation der Proben mit dem ABC-Reagenz für 30 min bei Raumtemperatur. Ein weiterer Waschvorgang und die Inkubation für 15 min mit Substratlösung folgten, bevor nach Durchführung der Hämotoxylin-Kerngegenfärbung und Entwässerung der Proben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylolersatz die Präparate in Eukitt eingebettet wurde.

2.2.14. Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

Die Isolation zellulärer RNA wurde mittels Qiagen RNA Isolierung Kit RNeasy (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Mittels Absorptionsspektrum (A_{260}/A_{280} -Quotient) wurde die Reinheit und isolierte Menge an Gesamt-RNA bestimmt. 1 µg der RNA wurde für die cDNA Synthese eingesetzt, wobei ein dT16-Oligonukleotid als Primer verwendet wurde. Die Reaktion erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C. Die synthetisierte cDNA wurde dann als Template für die PCR verwendet. Primersequenzen wurden aus der GenBank Datenbank verwendet und sind zusammen mit den Reaktionsbedingungen in Tabelle 1 zusammengefasst. Aliquots jeder PCR wurden elektrophoretisch in einem 1,8% Agarosegel aufgetrennt und die Banden mittels Ethidiumbromid Färbung sichtbar gemacht. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurde mittels KODAK 1D Software (KODAK, Stuttgart, Deutschland) densitometrisch quantifiziert.

2.2.15. Bestimmung der iNOS-Promotoraktivität

Die humane Lungenepithelzelllinie A549/8 war mit einem Konstrukt stabil transfiziert worden, in welchem ein 16-kb Fragment der humanen iNOS-Promotor Sequenz vor ein Luciferase Reportergen und ein Neomycin Resistenzgen kloniert worden war. Auf einer 12-well Zellkulturschale wurden 5×10^4 Zellen ausgesät und am nächsten Tag für den Versuch eingesetzt. Nach 24 Stunden waren die Zellen zu ca. 60% konfluent und in einer logarithmischen Wachstumsphase. Für Versuche mit konfluenten Zellen wurden 2×10^5 Zellen ausgesät. Die Inkubationsdauer wurde in allen Versuchen mit 8 Stunden konstant gehalten. Zur Analyse der Promotoraktivität wurden die Zellen in 200 µl Luciferase-Puffer lysiert und 15 min bei 4°C inkubiert. 50 µl des Extrakts wurde in den Test eingesetzt und mit 100 µl Luciferase-Substrat versetzt. Die Lumineszenz wurde in einem Luminometer (Fluorostar, BMG) detektiert. Die Licht-Einheiten (LU) der Proben wurden als relative iNOS-Promotoraktivität in % zur Kontrolle angegeben.

2.2.16. Bestimmung der MSP-Konzentration in humanem Serum mittels ELISA

Die MSP Konzentrationen in den humanen Seren von Psoriasis-Patienten und gesunden Kontroll-Personen sowie in Zellkultur-Überständen wurde durch einen DuoSet ELISA (R&D Systems, Europa, Abingdon, Großbritannien) quantifiziert. Hierzu wurden 96-well Zellkulturschalen mit 100µl eines Maus-anti-human MSP (1µg/ml) Antikörper über Nacht beschichtet, anschließend dreimal mit Wasch-Puffer (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2) gewaschen und für eine Stunde mit Blocking-Puffer (1% BSA, 5% Saccharose in PBS, pH 7,2 mit 0,05% Na-Azid) inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden je 100 µl Serum bzw. Kulturüberstand aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde mit 100 µl Detektions-Antikörper (biotinylierter Maus- anti-human MSP 1µg/ml) das MSP markiert. Nach Zugabe von 100 µl Streptavidin Meerrettich-Peroxidase und der gleichen Menge Substrat-Lösung (1:1 Gemisch H₂O₂ und Tetramethylbenzidine (R&D Systems) wurde die Lösung 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Extinktion wurde dann bei 540 nm im ELISA-Reader gemessen. Zur Erstellung der Eichkurven wurde rekombinantes MSP als Standard verwendet.

2.2.17. Klonierung der humanen Arginase-1

Die cDNA-Sequenz der humanen Arginase-1 wurde mittels RT-PCR aus HepG2-Zellen amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurde in der Genbank (Accession-Nr. M14502) ausgewählt (5'-CTGACTGGAGAGTCAAGTGC-3' (Basen 15-35) 5'-GAATGACATGGACACATAGTACC-3' (Basen 1384-1406). Die Amplifizierung der Sequenz erfolgte bei folgendenden PCR-Bedingungen: 40 x (30 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 55°C, 60 Sekunden bei 72°C) + 5 Minuten bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde nach der Auftrennung in einem 1%-igen low-melting Agarosegel mittels QIAEX II nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen) eluiert. Die gereinigte DNA wurde nach Durchführung einer gelelektrophoretischen Trennung zur Kontrolle in den pCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Nach dem Ausstreichen von Bakterienkulturen auf LB-Platten wurden diese über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach 16 Stunden wurden Klone ausgewählt und damit Flüssigkulturen von jeweils 100 ml angeimpft. Nach Inkubation für 8 Stunden in LB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin wurde eine Mini-Präparation (Qiagen) zur DNA-Isolation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Restriktion der Klone wurden diese im BMFZ sequenziert, die erhaltene Sequenz mit der Sequenz der humanen Arginase-1 aus der Genbank (Accession-Nr. 14502) verglichen und eine 100%-ige Identität festgestellt. Zur Klonierung in den Expresssionsvektor pCDNA3 (Invitrogen GmbH) wurde dann erneut eine Ligation durchgeführt, Bakterienkulturen angeimpft und eine Midi-Präparation nach Angaben des Herstellers (Qiagen) zur DNA-Isolation durchgeführt. Nach Restriktion und Konzentrationsbestimmung wurde die DNA im BMFZ erneut sequenziert und eine 100%-ige Übereinstimmung der Sequenz mit der publizierten Sequenz gefunden.

2.2.18. Transfektionen

Zur Überexpression der Arginase-1 in humanen Zellen wurden verschiedene Zellarten mittels Superfect Transfection Reagent (Qiagen) transfiziert. Dazu wurden 2 µg der pCDNA3 Vektoren mit bzw. ohne Arginasekonstrukt („leerer Vektor“) mit Protein- und Antibiotika-freiem Medium auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl SuperFect-Reagenz für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach der erfolgten Komplexbildung wurde 600 µl Medium mit Serum und Antibiotikum hinzugegeben und die Zellen für 3 Stunden unter Standardbedingungen mit diesem Gemisch kultiviert. Anschließend konnten die Zellen für die verschiedenen Versuche verwendet werden. Die Bestimmung der Arginase-Aktivität erfolgte durch einen Harnstoffassay 24-48 Stunden nach erfolgter Transfektion.

2.2.19. Statistische Analysen

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Werte wurden mit Student's t-test (zweiseitig für unabhängige Proben) berechnet.

Tabelle 1

Produkt/ Accession Nr.		Sequenz und PCR-Protokoll	Fragment -größe
Humane GAPDH M17851	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-ATGCCCGATGGCACCATCAGA-3' (Basen 153-175) 5'-TCTCCAGGCCCATCCTCCTGC-3' (Basen 548-568) 19 x (30'' 94°C, 30'' 58°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	416 bp
Humane iNOS D29675	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-ATGCCCGATGGCACCATCAGA-3' (Basen 1020-1040) 5'-TCTCCAGGCCCATCCTCCTGC-3' (Basen 1393-1413) 40 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	394 bp
Humane CAT-1 AF078107	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-CCAACGTCAATGATAGGACC-3' (Basen 1247-1266) 5'-CTGGTCCAGCTGCATCATGA-3' (Basen 1850-1869) 28 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	622 bp
Humane CAT-2 D29990	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-AGCCTGGCTTATCTTACGAC-3' (Basen 1293-1323) 5'-AATCTGACCCAAGTGTCTGC-3' (Basen 1741-1760) 32 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	467 bp
Humane Arginase-1 M14502	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-CTTAAAGAACAAGAGTGTGATG-3' (Basen 174-195) 5'-TTCTTCCTAGTAGATAGCTGAG-3' (Basen 702-723) Zellen : 34 x (30'' 94°C, 60'' 50°C; 60'' 72°C) + 5' 72°C Hautgewebe: 28 x (30'' 94°C, 60'' 50°C; 60'' 72°C) + 5' 72°C	549 bp
Humane Arginase-2 D86724	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-CTCCAGTTTGGGCTGCCACC-3' (Basen 194-213) 5'-TGTCACAGCAACACACTG-3' (Basen 723-744) 38 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	550 bp
Humanes Ki-67 NM_002417	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-ACTTGCCTCCTAATACGCC -3' (Basen 675-693) 5'-TTACTACATCTGCCCATGA -3' (Basen 1094-1112) 38 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	438 bp
Humanes MSP NM_020998	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-AATACCACCACTGCGGGCGT -3' (Basen 896-915) 5'-TCAGTATCCACTGCTCCTTCA -3' (Basen 1545-1565) 40 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	669 bp
Humaner RON XM_011068	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-GTCAAGGATGTGCTGATTCCC -3' (Basen 3236-3256) 5'-TCTGTGGAGTGAGGTACCTAATG -3' (Basen 4368-4391) 40 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	1155 bp
Humane nNOS V17327	Sense: Antisense: PCR Protokoll:	5'-GTCAAGGATGTGCTGATTCCC -3' (Basen 4482-4503) 5'-TCTGTGGAGTGAGGTACCTAATG -3' (Basen 4918-4937) 32 x (30'' 94°C, 60'' 60°C, 60'' 72°C) + 5' 72°C	455 bp

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zum L-Arginin-Metabolismus in der Haut

Obwohl das Verstehen der Bedeutung des freien Radikals NO als wichtigem Mediator von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in der Haut durch seine Beteiligung an einer Vielzahl zellulärer und molekularer Mechanismen im Laufe der letzten Jahre immer mehr an Bedeutung gewonnen hat (Bruch-Gerharz et al. 1998), war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig über den L-Arginin-Metabolismus und Transport und dessen Bedeutung für die iNOS Aktivität in der Haut bzw. in Hautzellen bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation der iNOS-Expression und der NO-Synthese untersucht und die Bedeutung des L-Arginin-Metabolismus und des L-Arginin-Transports für die Proliferation von Keratinozyten charakterisiert.

3.1.1. Regulation der iNOS-Expression unterliegt nicht einem negativen Feedback-Mechanismus

Im ersten Schritt wurde das Expressionsprofil der Zytokin-vermittelten Induzierbarkeit von iNOS-mRNA sowie die iNOS-Aktivität bestimmt. Dazu wurden kultivierte humane Keratinozyten mit einzelnen oder Kombinationen von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , je 1000 U) inkubiert und die iNOS-mRNA Expression mittels RT-PCR sowie die Enzymaktivität durch den Griess-Test ermittelt.

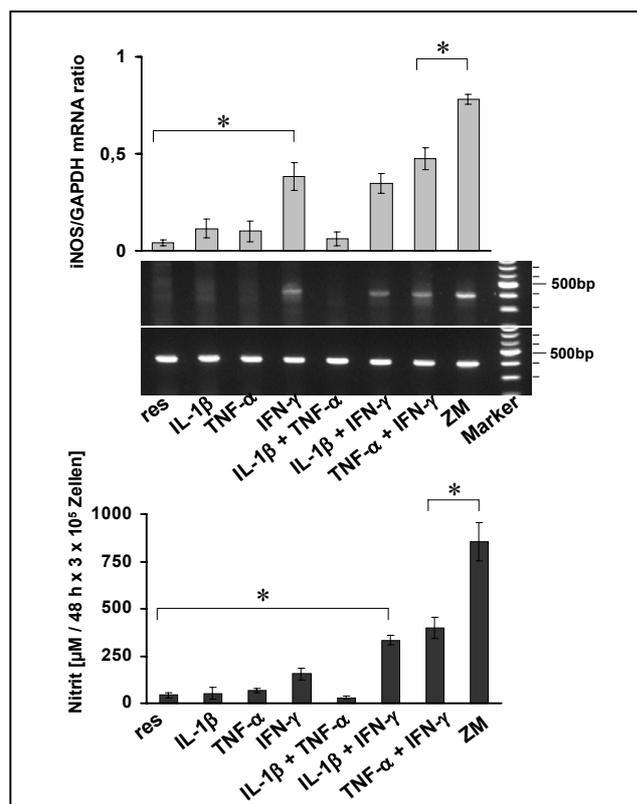


Abb. 9: Expressionsprofil der Zytokin-vermittelten Induzierbarkeit der iNOS mRNA und Aktivitätsbestimmung der iNOS in primären Keratinozyten. Humane Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit von einzelnen Zytokinen oder Zytokin-Kombinationen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus 3×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR ein spezifisches iNOS Fragment detektiert. Zur Quantifizierung wurden die PCR-Fragmente auf die GAPDH normiert und densitometrisch analysiert. In den Zellkulturüberständen wurde mittels Griess-Test die Nitritkonzentration als Maß für die iNOS Aktivität bestimmt. Residente Keratinozyten zeigen keine iNOS Expression und nur eine basale Nitritproduktion. Während in den Zellen, die mit allen drei Zytokinen aktiviert worden waren, die stärkste iNOS mRNA Expression und Aktivität gemessen wurde, führte die Aktivierung mit IFN- γ alleine oder in Kombination mit einem zweiten Zytokin sowohl zu einer signifikant erniedrigten mRNA Expression als auch zu einer um über 30% reduzierten iNOS Aktivität. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,002$

Da die Inkubation mit dem verwendeten Zytokinmix aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (jeweils 1000 Units) die stärkste iNOS-Expression und -Aktivität zur Folge hatte (Abb. 9), wurde diese Zytokinkombination zur Untersuchung NO-mediierter Effekte im weiteren Verlauf ebenfalls verwendet. Um zu untersuchen, ob das Produkt der iNOS-Aktivität NO selbst einen regulatorischen Effekt auf die Genexpression besitzt, wurden die Effekte von NO auf die iNOS-Promotoraktivität und iNOS Expression hin untersucht. Die Promotoranalysen wurden in einer Modellzelle epithelialen Ursprungs durchgeführt. Dazu wurde die humane Lungenepithelzelle A549/8 mit einem 16-kb Fragment der 5'-Region des humanen iNOS-Gens und einem Luziferase-Reportergenkonstrukt stabil transfiziert und der Effekt von NO auf die Promotoraktivität in bestimmt.

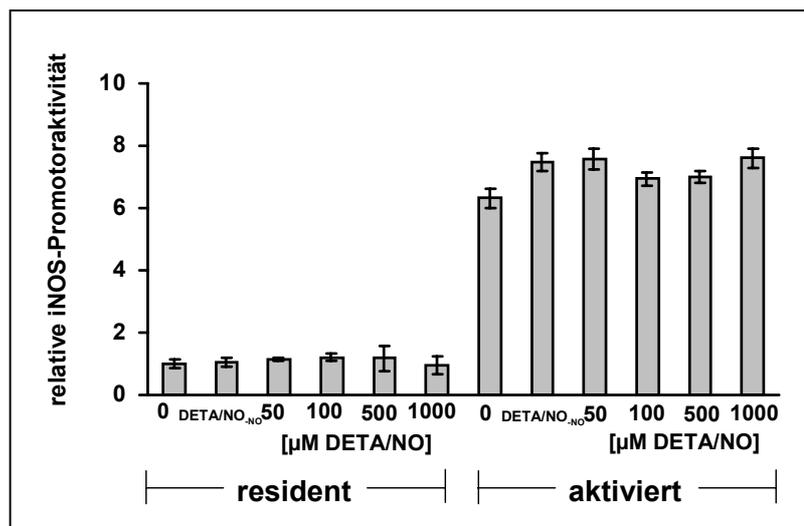


Abb. 10: NO hat keinen Effekt auf die iNOS-Promotoraktivität. Um den Effekt von NO die Aktivität des iNOS Promotors zu untersuchen, wurden A549/8 Zellen mit einem 16-kb Fragment der 5'-Sequenz des humanen iNOS Gen stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des NO-Donors DETA/NO in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 500 Units) 8 Stunden lang inkubiert. Weder in den residenten Zellen noch in den aktivierten Zellen konnte eine NO-vermittelte Veränderung der iNOS-Promotoraktivität beobachtet werden. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Zur Untersuchung der Effekte von NO auf die Genexpression der iNOS wurden humane Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen des NO-Donors DETA/NO in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine inkubiert und die Expression der iNOS-mRNA durch RT-PCR Analysen detektiert.

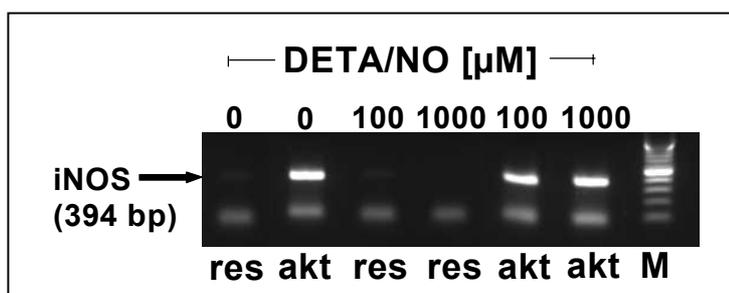


Abb. 11: NO hat keinen Effekt auf die iNOS-Expression in primären Keratinozyten. Humane Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit von der Zytokin-Kombinationen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) in Gegenwart des NO-Donors DETA/NO (100 bzw. 1000 μ M) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus 3×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR ein spezifisches iNOS Fragment detektiert.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass NO weder auf Promotorebene in einer Zelllinie (Abb. 10) noch auf der Ebene der mRNA-Expression in primären Keratinozyten (Abb. 11) regulatorische Effekte für die Genexpression der iNOS zeigt und das die iNOS-Expression somit nicht durch einen negativen Feedback-Mechanismus kontrolliert wird.

3.1.2 Ko-Expression von iNOS und Arginase-1 in humanen Keratinozyten

Neben der Regulation der Genexpression kann die iNOS-Aktivität auch durch die Expression anderer L-Arginin metabolisierender Enzyme moduliert werden (Kepka-Lenhart et al. 2000). Im folgenden wurde daher untersucht, ob Keratinozyten auch Arginasen exprimieren. Die Untersuchungen zeigen, dass die mitochondrial lokalisierte Arginase-2 auch in Hautzellen konstitutiv exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). In allen durchgeführten Untersuchungen zeigt sich die Arginase-2 Genexpression unverändert. Neben dieser ubiquitär exprimierten Isoform wird überraschenderweise auch die induzierbare Isoform, die Arginase-1 oder Leber-Typ Arginase, in residenten Keratinozyten konstitutiv exprimiert (Abb. 12). Um eine mögliche Interaktion dieser konstitutiv exprimierten Arginase-1 Ko-Expression auf die iNOS Aktivität zu untersuchen, wurden weitere *in vitro* Versuche durchgeführt.

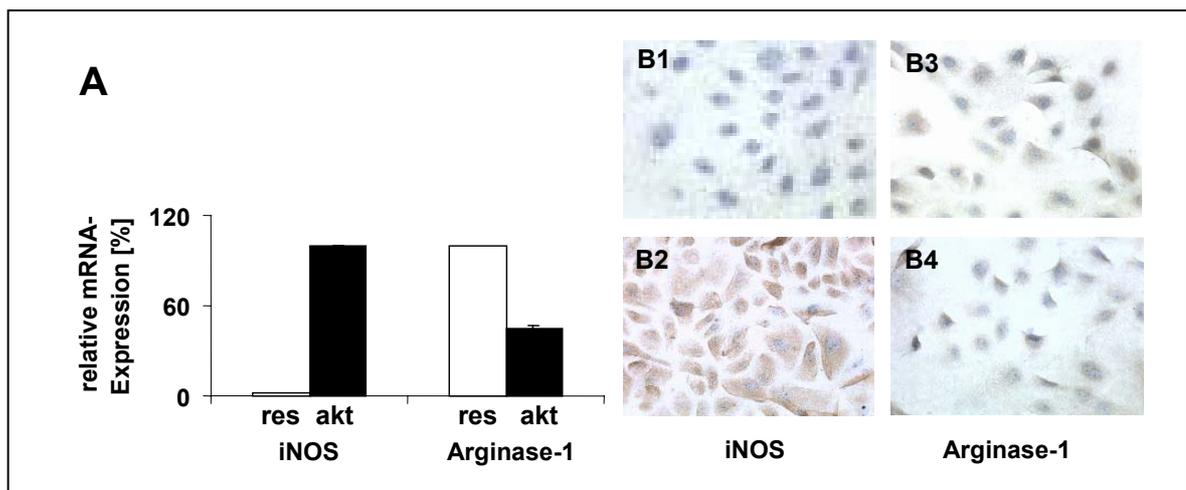


Abb. 12: iNOS und Arginase-1 sind in primären Keratinozyten koexprimiert. Humane Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit einer Zytokinkombination (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus 5×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR spezifische iNOS- und Arginase-1 Fragmente detektiert sowie parallel die Proteinexpression mittels spezifischer Antikörper und Immuncytochemie bestimmt. Residente Keratinozyten exprimieren konstitutiv Arginase-1 mRNA und Protein (**B3**), jedoch keine iNOS mRNA und kein iNOS Protein (**B1**). Die Zytokin-Aktivierung führt zu einer *de novo* iNOS Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (**B2**) und reprimiert gleichzeitig die Arginase-1 mRNA auf 45% des residenten Expressionsniveaus (**A**), während das Protein (**B4**) in seiner Expression nicht verändert ist. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Vergrößerung: 640x

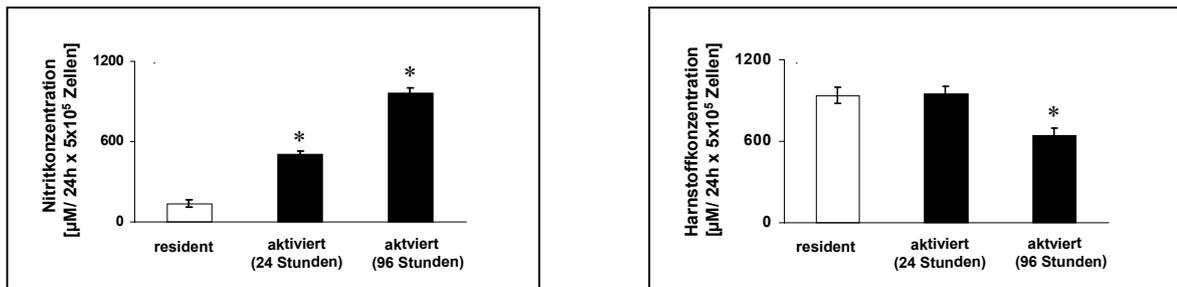


Abb. 13: Die Aktivierung mit Zytokinen des Th₁-Typs führt zu einer Induktion der iNOS Aktivität bei gleichzeitiger Hemmung der Arginase Aktivität. Residente und aktivierte (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) Keratinozyten wurden für 24 und 96 Stunden kultiviert. In den Zellkulturüberständen wurden die Nitritkonzentration als Maß für die iNOS Aktivität und die Harnstoffkonzentration als Maß für die Arginaseaktivität bestimmt. Die iNOS Aktivität steigt nach Zytokinaktivierung um den Faktor 4 nach 24 Stunden bzw. um den Faktor 8 nach 96 Stunden. Die Arginaseaktivität ist 24 Stunden nach Zytokinaktivierung unverändert gegenüber der Aktivität in residenten Zellen, während nach 96 Stunden eine Abnahme um 30% gemessen wurde. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,005$

Auf der Ebene der Genexpression wurde eine inverse, aber zeitlich stark verzögerte Regulation von iNOS und Arginase-1) durch proinflammatorische Zytokine gefunden. Während iNOS mRNA und Protein *de novo* induziert werden, wird die Arginase mRNA Expression auf $45 \pm 4\%$ des Niveaus residenter Zellen inhibiert (Abb.12. Dieser Effekt spiegelt sich auch in einer reduzierten Arginase Aktivität was aber wieder erst nach 4 Tagen messbar wird, während die NO-Synthese über den gesamten Zeitraum ansteigt (Abb.13).

3.1.3. Hemmung der Arginase-1 führt zu erhöhter iNOS-Aktivität in Keratinozyten

Die gefundene Koexpression von iNOS und Arginase läßt die Frage nach einer möglichen Interaktion der beiden Enzymaktivitäten aufkommen. Es sollte nun geklärt werden, ob die Hemmung des einen Enzyms die Aktivität des anderen Enzyms moduliert. Um diese Frage zu beantworten wurden Keratinozyten in An- und Abwesenheit von Zytokinen sowie in Gegenwart von iNOS- und Arginase-Inhibitoren kultiviert und die Aktivität beider Enzyme über die Quantifizierung der Stoffwechselprodukte bestimmt.

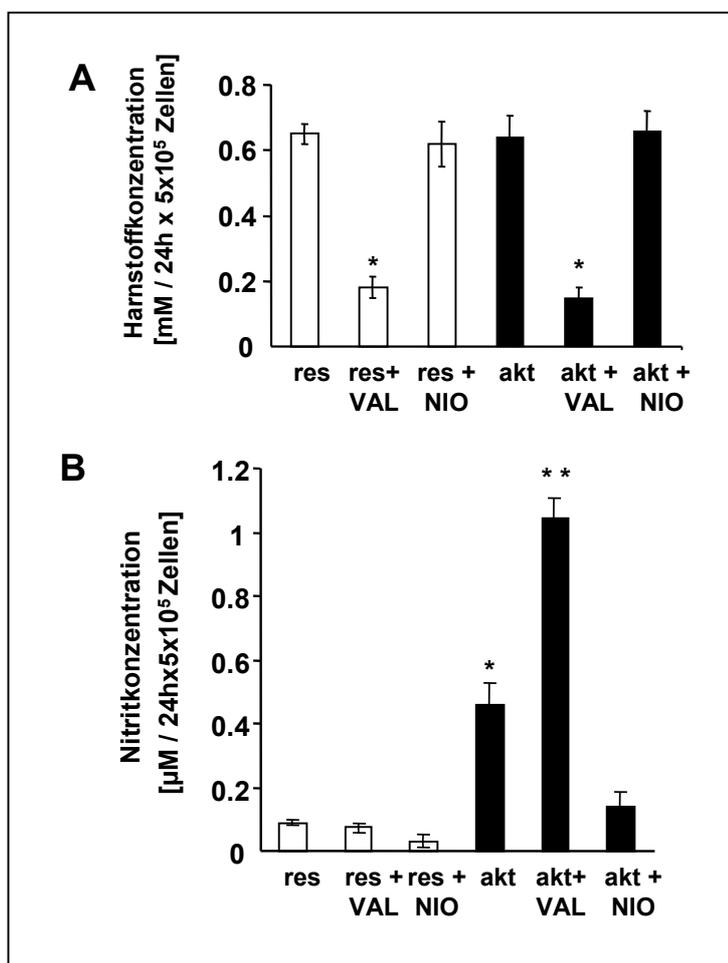


Abb. 14: Die Hemmung der Arginase führt zu einer erhöhten iNOS Aktivität, aber nicht umgekehrt. Residente und aktivierte (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit des spezifischen Arginase-Inhibitors (L-Valine, 10mM) und des spezifischen iNOS-Inhibitors (NIO, 250 μ M) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden in den Zellkulturüberständen die Harnstoffkonzentration (**A**) als Maß für die Arginase-Aktivität und die Nitritkonzentration (**B**) als Maß für die iNOS-Aktivität bestimmt. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,002$ und ** $p < 0,001$

Die Arginaseaktivität ist nach 24 Stunden in Zytokin-aktivierten Keratinozyten unverändert gegenüber residenten Zellen. Sie ist in beiden Fällen durch L-Valin um ca. 70% hemmbar und wird durch den NOS-Inhibitor NIO nicht beeinflusst. Nach Zytokin-Aktivierung und gleichzeitiger Inhibition der Arginase durch L-Valin wird eine weitere Verdopplung der Nitritkonzentration gegenüber nur aktivierten Zellen gemessen, die durch NIO gehemmt werden kann. Die durchgeführten Untersuchungen belegen einen Konkurrenz-Effekt zwischen Arginase-1 und iNOS Aktivität in Keratinozyten. Umgekehrt jedoch führt die Hemmung der iNOS-Aktivität zu keiner Veränderung der Arginase-Aktivität. Um den Mechanismus dieser Interaktion weiter zu charakterisieren, wurde das Arginase-1 Gen aus Leberzellen kloniert und mit Hilfe des Expressionsvektors pCDNA3 in humanen HaCat und DLD-Zellen überexprimiert. Die durchgeführten Experimente sollten zeigen, ob die Arginase-modulierte iNOS Aktivität Keratinozyten-spezifisch ist und ob die iNOS Modulation von der L-Arginin Konzentration abhängig ist. Dazu wurde die Arginase-1 in den humanen Zelllinien DLD und HaCat durch Transfektionen überexprimiert und die iNOS Aktivität in Abhängigkeit unterschiedlicher L-Arginin Konzentrationen gemessen (Abb.15). Die dazu verwendeten DLD Zellen, eine humane Lungenepithelzelllinie, weisen einen Defekt in der I- κ B Domäne auf, der zu einer latenten NF- κ B Aktivierung führt, so dass eine Zytokinaktivierung eine sehr starke iNOS-Expression und Aktivität zur Folge hat.

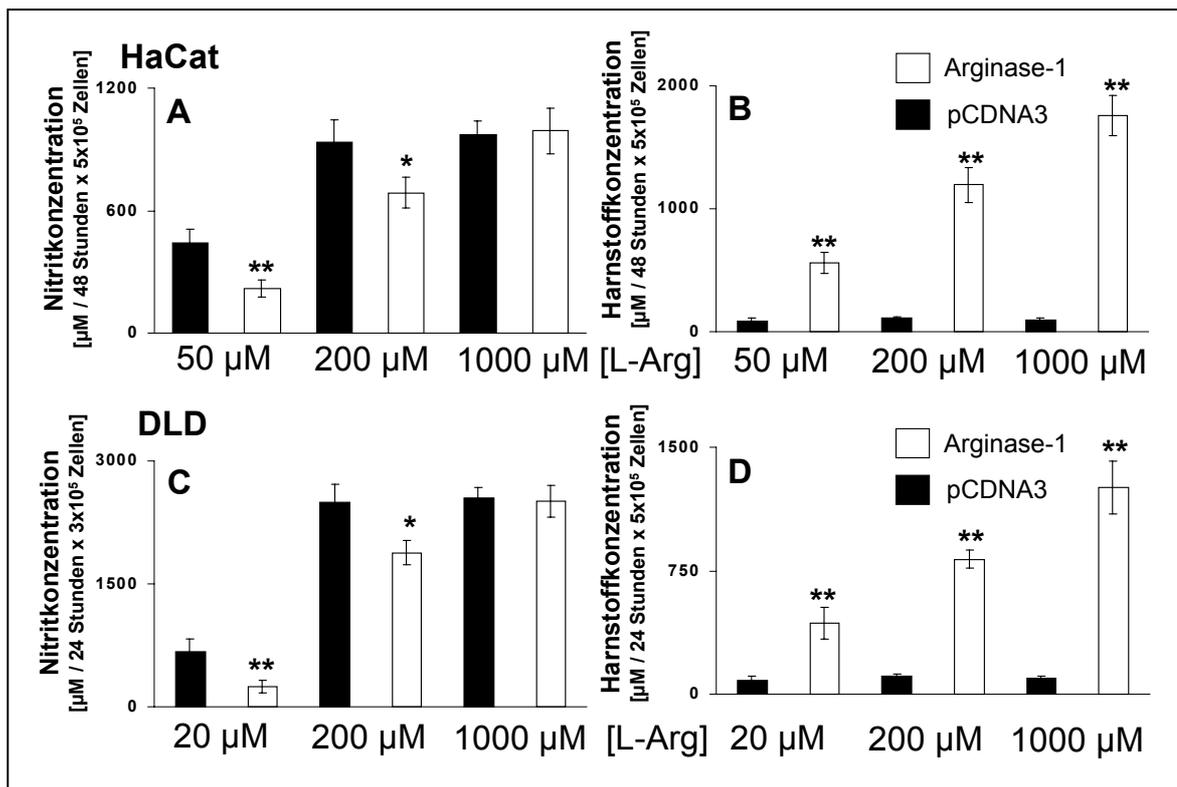


Abb. 15: Die Überexpression der Arginase-1 führt zu einer reduzierten iNOS-Aktivität. In HaCat und DLD-Zellen wurden mittels Transfektion die Arginase-1 überexprimiert (weiße Balken) und die Zellen in Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) mit unterschiedlichen L-Arginin-Konzentrationen 24 bzw. 48 Stunden lang inkubiert und die Nitritkonzentration (A) und (C) bestimmt. Zur Kontrolle wurde Zellen nur mit dem Expressionsvektor pCDNA3 (schwarze Balken) ohne Arginase-1 Konstrukt transfiziert. Angegebenen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Harnstoffkonzentrationen (B) und (D) parallel mitbestimmt. * $p < 0,002$ und ** $p < 0,005$

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass bei Konzentrationen von 1 mM L-Arginin (Konzentration der meisten Zellkulturmedien) in keinem der beiden Zelltypen ein Einfluss der Arginase-1 Expression auf die iNOS-Aktivität gefunden wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei physiologischen Konzentrationen im Bereich von 20 und 200 μ M L-Arginin eine deutlich verminderte iNOS Aktivität der Arginase-1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren. So wurde in DLD-Zellen bei einer Konzentration von 20 μ M eine um $64 \pm 8\%$ reduzierte iNOS-Aktivität gefunden, die bei 200 μ M L-Arginin auf $23 \pm 6\%$ abnahm (Abb. 15 C). In HaCat Zellen konnte bei einer Konzentration von 20 μ M noch kein Nitrit detektiert werden. Erst bei 50 μ M L-Arginin war eine iNOS-Aktivität messbar, die durch die Arginase-1 Expression um $46 \pm 7\%$ gehemmt wurde und bei 200 μ M L-Arginin zeigte sich eine $19 \pm 5\%$ reduzierte iNOS-Aktivität (Abb. 15 A). Die durchgeführten

Untersuchungen belegen, dass die Überexpression der Arginase-1 bei physiologischen L-Arginin-Konzentrationen die iNOS-Aktivität konzentrationsabhängig hemmt, während bei Konzentrationen von 1mM L-Arginin keine hemmende Wirkung auf die iNOS-Aktivität gefunden wurde.

3.1.4. Expression kationischer Aminosäure-Transporter (CAT) in humaner Haut

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der iNOS-Aktivität ist der Transport und die intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthasen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der Transporter von kationischen Aminosäuren in humaner Haut und den dort dominant vorkommenden Hautzellen untersucht und die Bedeutung für den L-Arginin Metabolismus in Keratinozyten charakterisiert. Im ersten Schritt wurde die Expression der Transporter CAT-1 und CAT-2 in humanen Hautbiopsien analysiert.

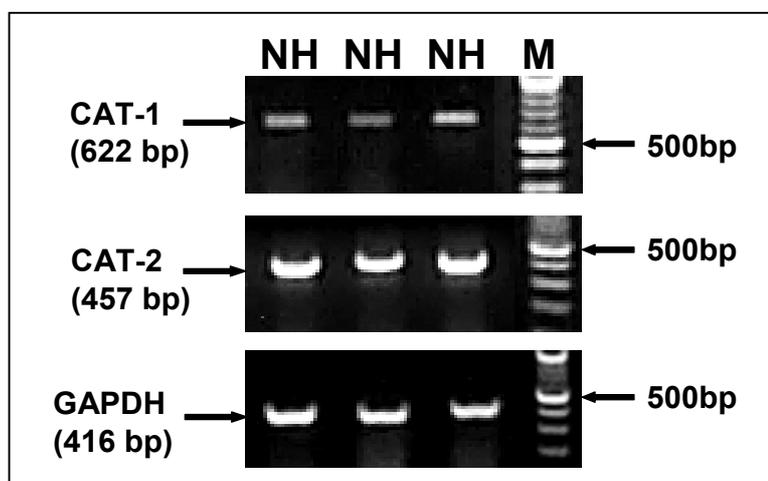


Abb. 16: Die mRNA der kationischen Aminosäure-Transporter CAT-1 und CAT-2 werden beide in humaner Haut exprimiert. Aus Hautgewebe wurde RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression der Transporter CAT-1 und CAT-2 detektiert. Zur Kontrolle wurde die Expression des „house-keeping“ Gens GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die Expressionsanalysen von 3 verschiedenen Hautproben von insgesamt 6 gesunden Probanden.

Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt eine konstitutive Expression der CAT-1 mRNA in allen untersuchten Biopsien. Überraschenderweise wird auch CAT-2 mRNA, die induzierbare Isoform, welche ansonsten nur nach proinflammatorischen Stimuli exprimiert wird (Irie et al. 1997), in gesunder humaner Haut exprimiert (Abb. 16). Durch die Analyse der drei wichtigsten

Zelltypen der Haut soll die zelluläre Lokalisation der Transporter aufgeklärt werden. Dazu wurden aus humanem Hautgewebe die dominanten Zelltypen Keratinozyten, Fibroblasten und dermale Endothelzellen isoliert kultiviert und auf die Expression von kationischen Aminosäure-Transportern hin untersucht. Die durchgeführten *in vitro* Versuche sollen weiterhin Aufschluss darüber bringen, ob die CAT-Expression durch proinflammatorische Zytokine und/oder NO moduliert wird. Zum Vergleich wurde eine humane Keratinozyten-Zelllinie (HaCat) mit untersucht.

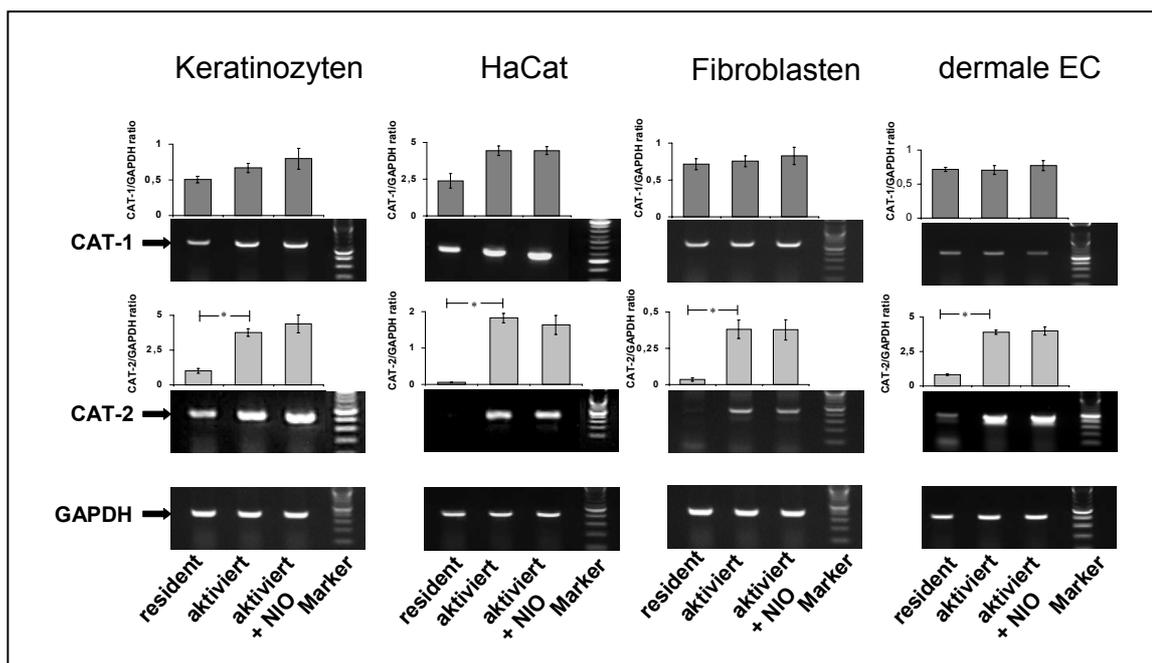


Abb. 17: Humane Hautzellen weisen unterschiedliche mRNA Expressionsmuster von kationischen Aminosäure-Transportern auf. Die unterschiedlichen Hautzellen wurden in Zellkulturen in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) und des spezifischen iNOS-Inhibitors (L-NIO, 250 μ M) für 24 Stunden kultiviert. RNA wurde aus 3×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR spezifische CAT-1 und CAT-2 Fragmente detektiert. Zur Quantifizierung wurden die PCR-Produkte auf die GAPDH normiert und densitometrisch analysiert. Das Transkript des CAT-1 Gens war in allen residenten Hautzellen exprimiert, wobei die Expression nur in der humanen Zelllinie HaCaT durch Zytokinaktivierung anstieg, während in allen anderen untersuchten Zellen die Expression weder NO- noch Zytokinabhängig war. Im Gegensatz dazu wurde CAT-2 mRNA nur in residenten Keratinozyten und dermalen Endothelzellen gefunden. Die Zytokinaktivierung bewirkte einen Anstieg der Expression um den Faktor 4, während in Fibroblasten und HaCaT Zellen eine *de novo* Expression der CAT-2 mRNA detektiert wurde. Keine der untersuchten Zellen zeigte eine NO-medierte differentielle Expression von CAT-2. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,002$

Das Ergebnis der zellulären Lokalisation der CAT-Transkripte zeigt ein differentielles Expressionsmuster in den untersuchten Hautzellen (Abb. 17). CAT-1 mRNA wird in allen residenten Hautzellen gefunden, wobei durch proinflammatorische Zytokine in primären Keratinozyten und der Keratinozytenzelllinie HaCat die CAT-1 mRNA Expression moderat erhöht wird. In

nicht-aktivierten Hautzellen konnte das Transkript des Transporters CAT-2 nur in Keratinozyten und dermalen Endothelzellen detektiert werden. Während die Zytokinaktivierung in Fibroblasten und HaCat zu einer *de novo* Expression der CAT-2 mRNA führt, wird die Expression in Keratinozyten um den Faktor $4,0 \pm 0,4$ und in dermalen Endothelzellen um $4,1 \pm 0,3$ gesteigert. Weder die CAT-1 noch die CAT-2 Expression ist unter Kontrolle von NO, denn Keratinozyten, Fibroblasten und auch dermale Endothelzellen zeigen nach Zytokinaktivierung zwar eine Induktion der iNOS und NO-Synthese (Abb.9), jedoch bleibt in Gegenwart des spezifischen Inhibitors NIO die CAT mRNA Expression unverändert. In neueren Publikationen (Kawahara et al. 2001) wird die Induktion von CAT-2 nach proinflammatorischen Stimuli sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als wesentlich für die Substratversorgung der parallel induzierten iNOS diskutiert. Da hierbei die zeitliche Abfolge der Induktion einen entscheidenden Parameter für die Verfügbarkeit von L-Arginin darstellen könnte, wurden die Kinetiken der Induktion von CAT-2 bzw. von iNOS in Keratinozyten miteinander verglichen.

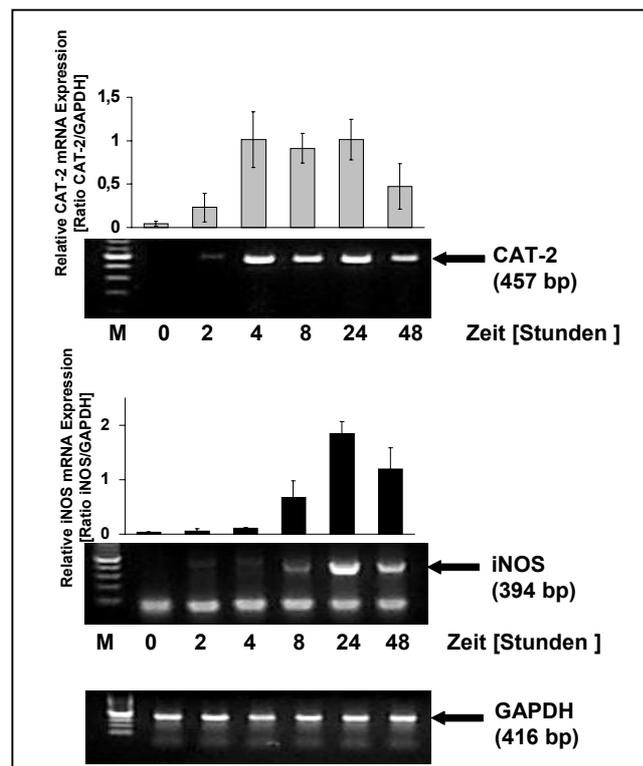


Abb. 18: Die Zytokin-vermittelte Induktion von CAT-2 verläuft schneller als die der iNOS. Keratinozyten wurde für unterschiedlichen Zeiten (0 - 48 Stunden) mit dem beschriebenen Zytokinmix inkubiert, RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression von CAT-2 und iNOS mRNA detektiert, densitometrisch ausgewertet und zur Normierung auf die Expression des „house-keeping“ Gens GAPDH bezogen. Dargestellt sind die Expressionsanalysen von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Die Induktionskinetik der CAT-2 Expression läuft signifikant schneller ab als die der iNOS. Während die CAT-2 mRNA Expression bereits nach 4 Stunden ein Maximum erreicht und für 24 Stunden auf diesem hohen Expressionsniveau verbleibt, ist ein iNOS spezifisches Signal erst nach 8 Stunden zu detektieren, welches nach 24 Stunden sein Maximum erreicht. Dadurch erscheint die CAT-2 mediierte Substratversorgung der iNOS möglich, da die intrazelluläre L-Arginin Konzentration bereits vor der Expression des aktiven iNOS Enzyms erhöht werden kann. Um den funktionellen Zusammenhang zwischen CAT-mediertem L-Arginin Transport und iNOS-Aktivität genauer zu charakterisieren wurden Keratinozyten in Anwesenheit hoher Konzentrationen (10 mM) der kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin kultiviert, da diese Aminosäuren mit L-Arginin um den Transport in die Zelle konkurrieren. Durch die Bestimmung der NO-Synthase Aktivität mittels Quantifizierung des NO-Oxidationsproduktes Nitrit wurde die Abhängigkeit vom L-Arginin Transport quantifiziert.

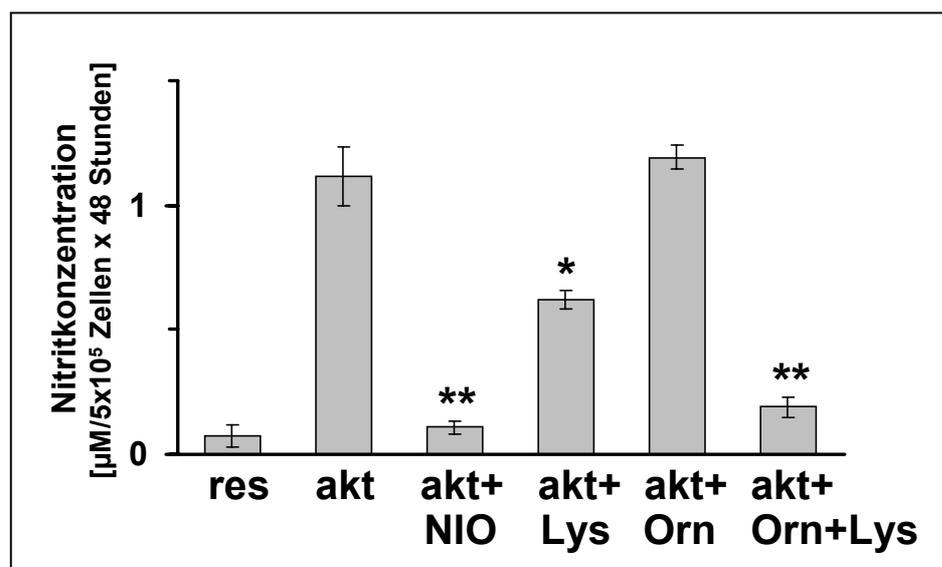


Abb. 19: Hemmung des CAT-medierten L-Arginin Transports führt zu einer reduzierten iNOS-Aktivität. Residente und aktivierte (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit eines spezifischen iNOS-Inhibitors (L-NIO, 250 μ M) sowie den kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin (je 10 mM) inkubiert. Nach 48 Stunden wurden in den Zellkulturüberständen die Nitritkonzentration als Maß für die iNOS Aktivität bestimmt. Die Zytokinaktivierung bewirkt einen Anstieg der Nitritkonzentration um ca. den Faktor 9, der durch NIO vollständig hemmbar ist. Die Supplementierung mit L-Lysin oder eine Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin bewirkt eine signifikante Reduktion der iNOS Aktivität, wohingegen L-Ornithin allein keinen Effekt hat. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,002$ und ** $p < 0,001$

Die Aktivierung von Keratinozyten führt nach 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration s.o., die durch den NOS-Inhibitor NIO vollständig aufgehoben werden kann. Die Supplementierung des Kulturmediums mit L-Lysin

oder einer Kombination aus den kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin führen zu einer signifikant erniedrigten Nitrit-Akkumulation von 56 ± 4 % für L-Lysin und von 21 ± 5 % für die Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin, wohingegen L-Ornithin alleine die iNOS Aktivität nicht beeinflusst. Es konnte somit gezeigt werden, dass der CAT-medierte Transport von L-Arginin von essentieller Bedeutung für die iNOS-Aktivität ist und die CAT-Expression eine wichtige Funktion in der Regulation der iNOS-Aktivität einnimmt.

3.1.5. CAT-mediierter L-Arginin-Transport reguliert die Arginase-Aktivität und beeinflusst die Keratinozyten-Proliferation

Durch die Abhängigkeit der iNOS Aktivität von der L-Arginin-Konzentration und der Arginase-1 Expression sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob auch die Arginase-Aktivität vom CAT-medierten L-Arginin Transport abhängt.

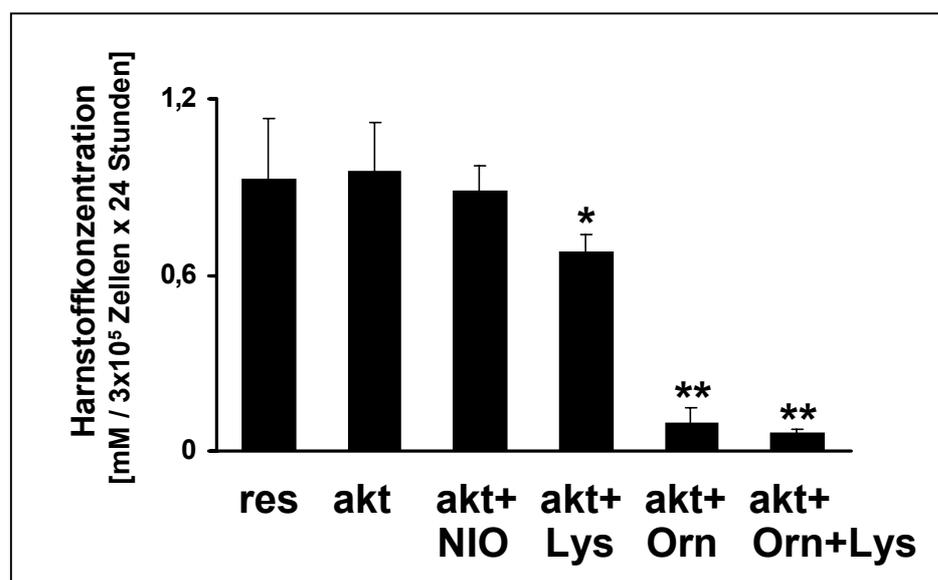


Abb. 20: Die kompetitive Hemmung des L-Arginintransport führt zu einer reduzierten Arginase-Aktivität. Residente und aktivierte (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit des spezifischen iNOS-Inhibitors (L-NIO, 250 μ M) sowie den kationischen Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin (je 10 mM) inkubiert. Die Analyse der Harnstoffkonzentrationen nach 24 Stunden zeigte eine hohe Enzymaktivität sowohl in residenten als auch aktivierten Zellen. Die Supplementierung mit L-Lysin führte zu einer um 36 ± 4 % erniedrigten Arginaseaktivität verglichen mit den aktivierten Zellen, während die Zugabe von L-Ornithin alleine oder in Kombination mit L-Lysin eine Inhibition um mehr als 90% bewirkte. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,005$ und ** $p < 0,001$

Die Messung der Harnstoffkonzentration als Maß für die Arginase-Aktivität erfolgte in den gleichen Zellkulturüberständen, die für die Bestimmung der iNOS-Aktivität (Abb. 19) verwendet wurden. In Übereinstimmung mit der gefundenen konstitutiven Expression beider Arginase-Isoformen wurden relativ hohe Harnstoffwerte gemessen, die durch die Zytokinaktivierung in den ersten 24 Stunden nicht beeinträchtigt wurden. Unter kompetierenden Bedingungen wurde eine reduzierte Arginase Aktivität von 30 ± 5 % bei Zugabe von 10 mM L-Lysin und von 90 ± 4 % bei Zugabe von 10 mM L-Ornithin im Vergleich zu residenten Zellen ermittelt. Eine Kombination beider Aminosäuren führte zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Arginase-Aktivität. Diese Daten belegen, dass der CAT-medierte Transport von L-Arginin sowohl für die iNOS als auch für die Arginase Aktivität in Keratinozyten essentiell ist. Die Aktivität dieser beiden Enzyme sind entscheidende Parameter für die Zellproliferation. Jedoch steuern unterschiedliche molekulare Mechanismen diesen Prozess: Arginasen bilden neben Harnstoff als Reaktionsprodukt L-Ornithin, welches die gemeinsame Vorstufe aller Polyamine ist, die ihrerseits für die Bildung der extrazellulären Matrix benötigt werden (Kepka-Lenhart et al. 2000). NO hingegen kann durch direkte und indirekte Effekte eine differentielle Genexpression von Proliferations- und Differenzierungsmarkern bewirken (Krischel et al. 1998). Um die Effekte des CAT-medierten L-Arginin-Transports auf die Keratinozyten-Proliferation zu untersuchen, wurden residente Zellen in Anwesenheit verschiedener kationischer Aminosäuren über 5 Tage kultiviert und das Zellwachstum quantifiziert.

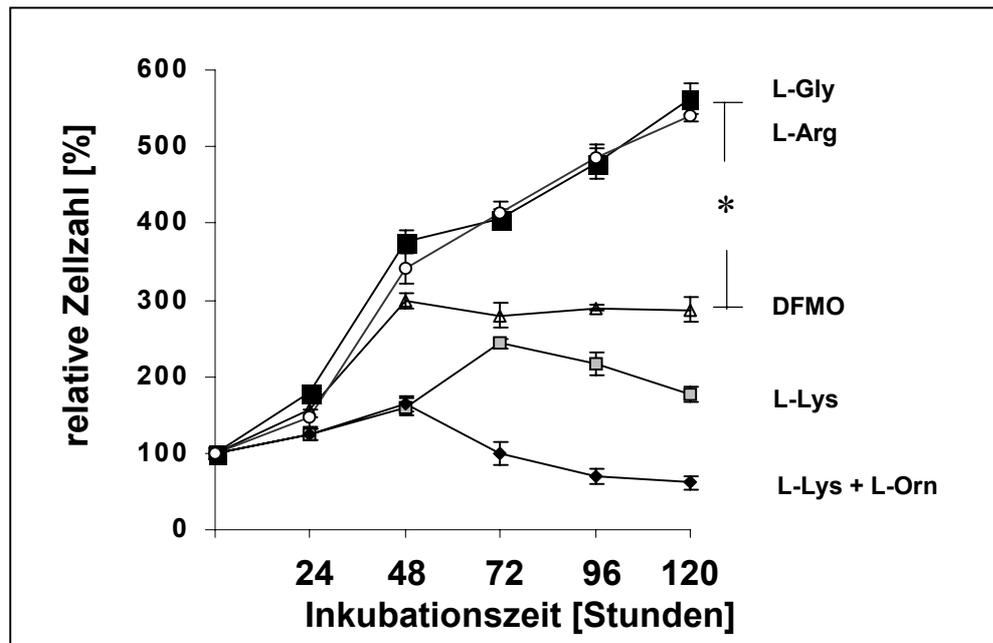


Abb. 21: Die Konkurrenz des L-Arginin Transports führt zu einer Verlangsamung der Proliferation humaner Keratinozyten. Keratinozyten wurden in kontinuierlicher Anwesenheit von Aminosäuren Supplementationen (■ = L-Glyzin [20mM], □ = L-Lysin [20mM], ◆ = L-Lysin + L-Ornithin [je 20mM], ○ = L-Arginin [20mM] and △ = DFMO [5mM]) für 5 Tage kultiviert. Die Inhibition des L-Arginin Transports durch L-Lysin und die Inhibition der Polyamin Synthese durch DFMO, einem spezifischen Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase, bewirken eine signifikante Verlangsamung der Proliferation verglichen mit der L-Glyzin supplementierten Kontrolle. Während L-Arginin keinen Effekt auf die Proliferation hat, führt die Kombination von L-Lysin und L-Ornithin zu einem Zellverlust. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,01$

Im Vergleich zur L-Glyzin supplementierten Kontrolle verlangsamt die Inhibition der Arginase durch L-Lysin die Zellproliferation um 40 % in den ersten 3 Tagen, mit einem anschließenden Kontaktverlust der Zellen in der Kulturschale. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit 10 mM L-Arginin zu keiner veränderten Proliferation. Der Ornithin-Decarboxylase Inhibitor DFMO verhindert die weitere Metabolisierung des L-Ornithins und führt in den ersten 48 Stunden zu einer moderat erniedrigten Zellproliferation, die nach 72 Stunden in einen Arrest des Zellzyklus mündet, ohne Apoptosen oder Kontaktverlust. Die vorliegenden Daten belegen somit eine wichtige Rolle des CAT-medierten Transports von L-Arginin für die NO-unabhängige Keratinozyten-Proliferation. Die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse belegen den Zusammenhang zwischen L-Arginin Verfügbarkeit und iNOS Aktivität, woraus Konsequenzen für die Proliferation von Keratinozyten entstehen. Daher wurde im folgenden die Bedeutung der iNOS Expression und Regulation der Aktivität in Entzündungen am Beispiel der entzündlichen, hyperproliferativen Hauterkrankung Psoriasis untersucht.

3.2. Untersuchungen zur Bedeutung der iNOS-Expression und Regulation der iNOS-Aktivität in Entzündungen am Beispiel der entzündlichen, hyperproliferativen Hauterkrankung Psoriasis

Psoriatische Keratinozyten sind durch eine „konstitutive“ iNOS Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene charakterisiert (Bruch-Gerharz et al. 1996), wodurch möglicherweise hohe NO-Konzentrationen in den Keratinozyten der Epidermis von Psoriasis-Patienten synthetisiert werden. *In vitro* Untersuchungen mit NO-Donoren an human Keratinozyten haben gezeigt, dass NO einen biphasischen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung hat: während niedrige NO-Donor-Konzentrationen ($< 250 \mu\text{M}$) eine gesteigerte Proliferationsrate bewirken, führen hohe NO-Konzentrationen ($\geq 250 \mu\text{M}$) zur terminalen Zelldifferenzierung (Krischel et al. 1998). Somit liegen diese beiden Ergebnisse im Widerspruch zu der in der Psoriasis gefundenen Situation: die iNOS Expression und die daraus resultierenden potentiell hohen NO-Konzentrationen sollten einen anti-proliferativen Effekt auf die epidermalen Keratinozyten bewirken, doch gerade dieser Zelltyp ist in der Psoriasis durch eine massive Hyperproliferation charakterisiert. Durch die folgenden Untersuchungen soll eine Erklärung für dieses „iNOS-Psoriasis-Paradoxon“ gefunden werden. Da die Regulation der iNOS-Aktivität durch andere L-Arginin metabolisierende Enzyme und den Transport kationischer Aminosäuren moduliert werden kann (siehe 3.1.4 und 3.1.5.), wurde erstmalig psoriatische Haut auf die Expression dieser regulatorischen Parameter hin untersucht.

3.2.1 Expression der kationischen Aminosäure Transporter CAT-1 und CAT-2 in Hautläsionen von Psoriasis-Patienten

Die Verfügbarkeit von L-Arginin als gemeinsames Substrat der NO-Synthasen und der Arginasen nimmt eine wichtige Rolle für die Regulation von Proliferation und Differenzierung in Keratinozyten ein. Daher wurde im ersten Schritt die Expression der Transporter CAT-1 und CAT-2 in psoriatischen Hautläsionen im Vergleich zu gesunder Haut untersucht (Abb. 22).

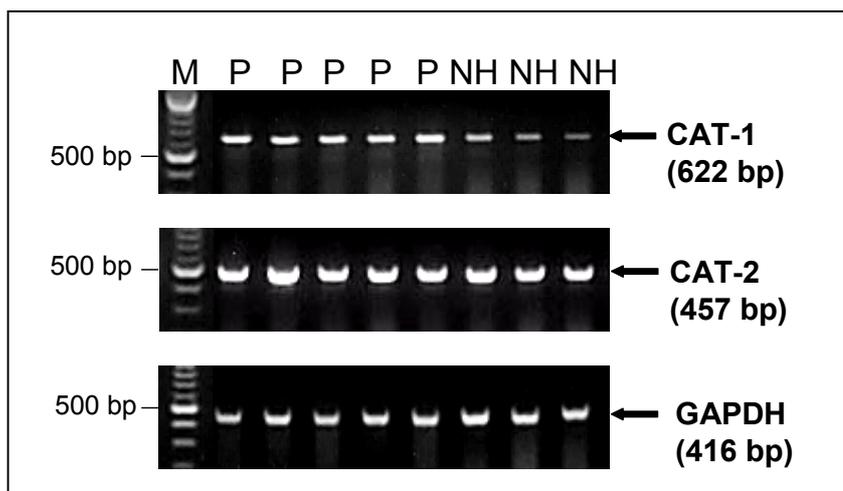


Abb. 22: Die mRNA kationischer Aminosäure-Transporter CAT-1 und CAT-2 sind in Hautbiopsien von Patienten mit Psoriasis und gesunden Probanden exprimiert.

Aus Hautgewebe wurde RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression von CAT-1 und CAT-2 analysiert. Zur Kontrolle wurde die Expression auf das „house-keeping“ Gen GAPDH normiert. Dargestellt sind die Expressionsanalysen von läsionalen Psoriasisproben „P“ (n = 5) und Hautproben gesunder Probanden „NH“ (n = 3).

Spezifische Fragmente der CAT-1 mRNA (622 bp) und der CAT-2 mRNA (457 bp) sind sowohl in psoriatischen Läsionen als auch in den Hautproben der gesunden Probanden exprimiert. In gesunder Haut ist die Expression des für L-Arginin hochaffinen Transporters CAT-1 gegenüber den Psoriasisproben leicht erniedrigt, während die induzierbare Isoform CAT-2 mit erhöhter L-Arginin Transportkapazität in psoriatischen Läsionen und gesunder Haut etwa gleich exprimiert werden. Somit erscheint die intrazelluläre L-Argininversorgung in psoriatischen Läsionen gewährleistet zu sein. Die vermehrte Expression anderer L-Arginin metabolisierender Enzyme könnte aufgrund der Konkurrenz um das gemeinsame Substrat eine wichtige Rolle in der Modulation der iNOS-Aktivität einnehmen, wie bereits in den *in vitro* Untersuchungen an primären Keratinozyten gezeigt wurde. Daher wurde im folgenden die Expression der Arginase-1 in psoriatischer Haut analysiert.

3.2.2. Überexpression der Arginase-1 als limitierender Faktor der NO-Synthese in psoriatischen Keratinozyten

Hautbiopsien von insgesamt 10 Psoriasis-Patienten und von 5 gesunden Probanden wurden parallel auf die Expression von iNOS und Arginase-1 hin untersucht. Wie in Abbildung 23 gezeigt, wird in Psoriasisbiopsien eine starke iNOS und Arginase-1 Expression sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene detektiert.

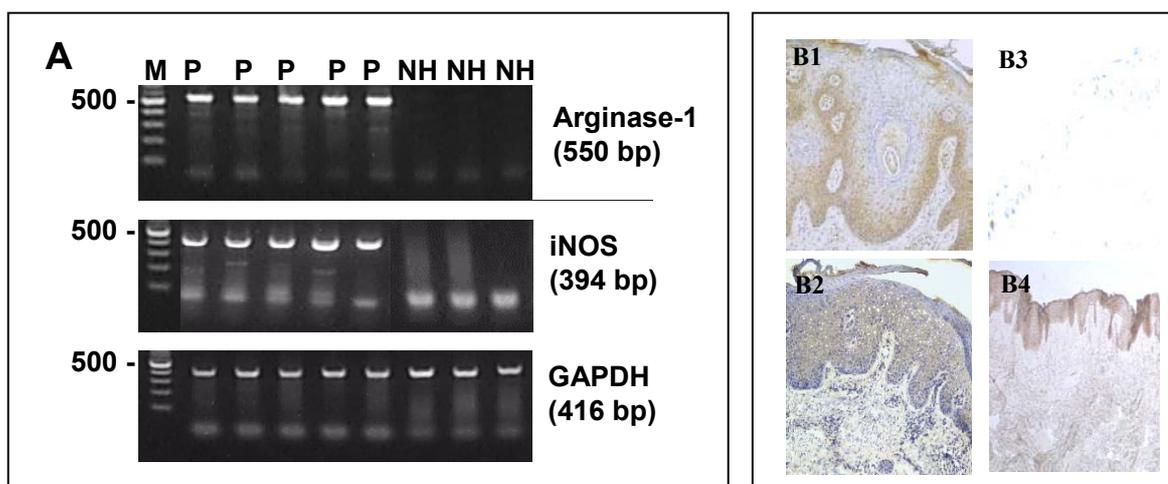


Abb. 23: Arginase-1 ist in Hautbiopsien von Psoriasispatienten überexprimiert.

(A) Aus Hautgewebe wurde RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Mittels spezifischer Primer wurde die Expression der Arginase-1 und der iNOS mRNA detektiert. Zur Kontrolle wurde die Expression des „house-keeping“ Gens GAPDH bestimmt. Dargestellt sind die Expressionsanalysen von läsionalen Psoriasisproben „P“ (n = 5) und Hautproben gesunder Probanden „NH“ (n = 3). Die iNOS mRNA (394 bp) konnte nur in den psoriatischen Läsionen nachgewiesen werden. Die Arginase-1 mRNA ist in den psoriatischen Läsionen sehr stark exprimiert, während die Hautproben der gesunden Probanden unter diesen PCR Bedingungen (28 Zyklen) negativ erscheinen. Doch nach weiteren 6 Zyklen konnte ein schwaches Signal detektiert werden, wobei bei den Psoriasisproben unter diesen Bedingungen der Linearitätsbereich der Methode nicht mehr gewährleistet ist. (B) Immunhistochemische Lokalisation des iNOS und Arginase-1 Proteins in Hautbiopsien von Psoriasispatienten. Die Expression des iNOS und des Arginase-1 Proteins ist in den epidermalen Keratinozyten von psoriatischen Läsionen der Basalschicht nachweisbar (B1 und B2). Weder in den Keratinozyten der gesunden Probanden noch in anderen Hautzellen konnte iNOS Protein detektiert werden (B3). Arginase-1 Protein konnte mit einem deutlich erniedrigtem Expressionsniveau auch in den Keratinozyten gesunder Probanden gezeigt werden (B4). Vergrößerung: 100x für B1, B2 und B4 sowie 300x für B3

Während iNOS in gesunder Haut nicht exprimiert wird, lässt sich ein schwaches Arginase-1 Signal nach 6 weiteren Zyklen in der PCR nachweisen (nicht gezeigt), wodurch eine vielfach erhöhte Arginase-1 mRNA Expression in psoriatischer Haut belegt wird. Es konnte somit *ex vivo* gezeigt werden, dass durch die Überexpression der Arginase-1 in psoriatischen Hautläsionen ein weiteres Enzym des Argininstoffwechsels an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sein könnte.

3.2.3. iNOS-Aktivität in Läsionen von Psoriasis-Patienten

Da eine direkte Messung der iNOS-Aktivität *in vivo* in der Haut nicht möglich ist, wurde ein indirekter Nachweis gewählt. Dazu wurde das Vorkommen von Proteinen mit S-Nitrosocystein-Resten die durch endogen synthetisiertes NO gebildet werden in psoriatischen Hautschnitten im Vergleich zu Hautschnitten gesunder Probanden bestimmt. Zusätzlich wurden als *ex vivo* Entzündungsmodell Kurzzeit-Organokulturen humaner Haut in Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine kultiviert und als Positiv-Kontrollen in Anwesenheit von NO-Donoren verwendet.

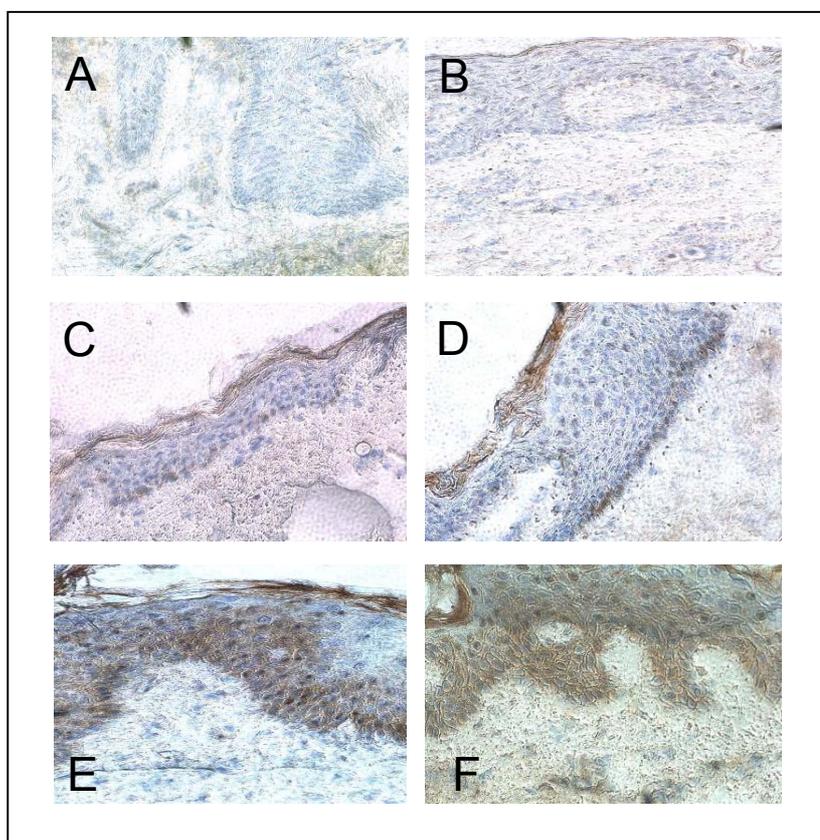


Abb. 24: Fehlende S-Nitrosocysteinreste in Hautbiopsien von Psoriasis-Patienten.

Zur Durchführung immunohistochemischer Analysen wurde die Haut geschnitten und die Expression von S-Nitrosocystein-Resten der Hautproben mit denen von läsionalen (A) und nicht-läsionalen (B) Gewebeschnitten von Psoriasis-Patienten und einer mitgeführten Negativ-Kontrolle (C) verglichen. Zur Kontrolle wurden Kurzzeit-Organokulturen gesunder Haut in Ab- (D) bzw. Anwesenheit (E) von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) bzw. 250 μ M des NO-Donors DETA/NO in Kombination mit Zytokinen (F) für 24 Stunden kultiviert. Vergrößerung: 300x

Der Vergleich der Gewebe zeigt, dass in gesunder Haut (Abb. 26 D) keine Färbung nach Inkubation mit Antikörpern spezifisch für S-Nitrosocystein zu finden ist. Eine Zytokin Aktivierung führt zu einer Verstärkung dieser Expression (Abb. 26 E). Die

Gabe des NO-Donors DETA/NO (250 μ M) in Kombination mit Zytokinen bewirkte eine weitere Zunahme von S-Nitrosocysteinen und zeigt auch in der tieferliegenden Zellschichten der Epidermis eine intensive Braunfärbung (Abb. 26 F). Weder in den läsionalen (Abb. 26 A) noch in den nicht läsionalen (Abb. 26 B) Gewebeschnitten der psoriatischen Haut konnte S-Nitrosocystein detektiert werden.

3.2.4. Exogenes und endogenes NO hemmen die Keratinozyten- Proliferation

Die Modulation der Keratinozyten-Proliferation durch NO-Donoren konnte bereits gezeigt werden (Krischel et al. 1998), doch bisher waren keine Daten publiziert, die eine Modulation auch durch endogen produziertem NO belegen. Im folgenden wurde dieser Frage nachgegangen, indem in Zellkulturen von Keratinozyten eine Induktion der iNOS durch proinflammatorische Zytokine hervorgerufen wurde und der Effekt der daraus resultierenden NO-Synthese auf den Proliferationsmarker Ki-67 analysiert wurde. Parallel wurde ein Kontrollexperiment in Anwesenheit von Hydrocortison im Medium durchgeführt, wodurch die iNOS-Induktion gehemmt wird.

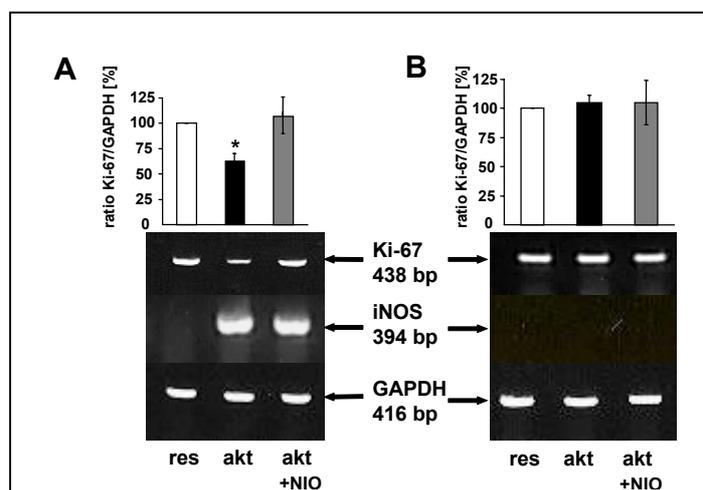


Abb. 25: Endogenes NO hemmt die Proliferation in kultivierten Keratinozyten.

(A) Primäre Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit des NOS Inhibitors NIO (250 μ M) mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) aktiviert. Infolge dessen kam es zu einer starken iNOS mRNA Induktion und einer signifikanten Reduktion der Ki-67 mRNA auf 61 ± 9 % verglichen mit der residenten Kontrolle. Dieser Effekt konnte durch NIO vollständig aufgehoben werden. In einem Kontrollexperiment (B) wurden die Aktivierung der Keratinozyten in einem Hydrocortison-haltigen Medium durchgeführt, wodurch weder eine iNOS mRNA Induktion noch eine Reduktion der Ki-67 Expression zu beobachten war. Zur Quantifizierung wurden die PCR-Produkte auf die GAPDH normiert und densitometrisch analysiert. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.001$

Es wird in primären Keratinozyten eine signifikante Reduktion der Ki-67 mRNA durch endogen synthetisiertes NO gefunden, die im Kontrollexperiment ohne die iNOS Induktion nicht zu sehen ist. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl exogenes als auch endogen synthetisiertes NO eine entscheidende Funktion in der Regulation der Proliferation von Keratinozyten einnehmen.

Abschließend wurden diese Effekte durch Wachstumskurven belegt, indem gezeigt wurde, dass sowohl exogenes NO in Form eines NO-Donors als auch endogen produziertes NO zu einem Stop der Keratinozyten-Proliferation führen.

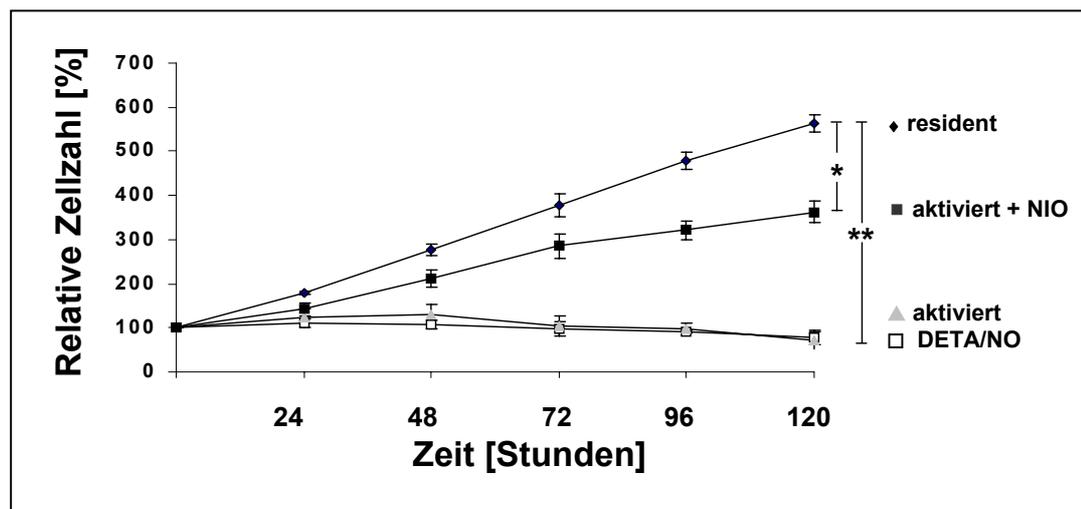


Abb. 26: Exogenes und endogenes NO hemmen die Keratinozyten-Proliferation.

Keratinozyten wurden mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) in An- und Abwesenheit des NOS-Inhibitors NIO (250 μ M) sowie mit DETA/NO (100 μ M) für 5 Tage kultiviert und die Zellzahl mittels Neutralrotfärbung quantifiziert (◆ = resident, ■ = aktiviert + NIO, ▲ = aktiviert, □ = DETA/NO [100 μ M]). Die Zytokinaktivierung und daraus resultierende endogene NO-Produktion der Keratinozyten bedingt einen sofortigen Proliferationsstopp, welcher durch NIO zu ca. 60% aufgehoben werden kann. Die Zugabe des exogenen NO-Donors bewirkt ebenfalls einen Stopp der Proliferation und leitet die terminale Differenzierung der Zellen ein. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

*p<0,005 und **p<0,001

3.2.5. Expression von MSP und RON in der humanen Haut

Die Regulation der iNOS Genexpression ist ein komplexer Prozess, der im Wesentlichen auf transkriptioneller Ebene geschieht (de Vera et al. 1996). In humanen Makrophagen (Morrison and Correll 2002) konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu Zytokinen u.a. auch MSP (Makrophagen stimulierendes-Protein) und sein Rezeptor RON „Recepteur d’origine nantais“ zur Regulation sowohl der iNOS als auch der Arginase-1 Expression und Aktivität beitragen. Zu Beginn dieser Arbeit waren lokale Synthese und Effekte von MSP und RON in humaner Haut oder Keratinozyten unbekannt. Daher bestand ein Teil der vorliegenden Arbeit darin, aufzuklären, ob MSP und RON auch in der Haut eine regulatorische Funktion in diesen komplexen Prozessen einnehmen.

Hierzu wurde im ersten Schritt die Expression von MSP und seines entsprechenden Rezeptors RON in humaner Haut bzw. Hautzellen untersucht.

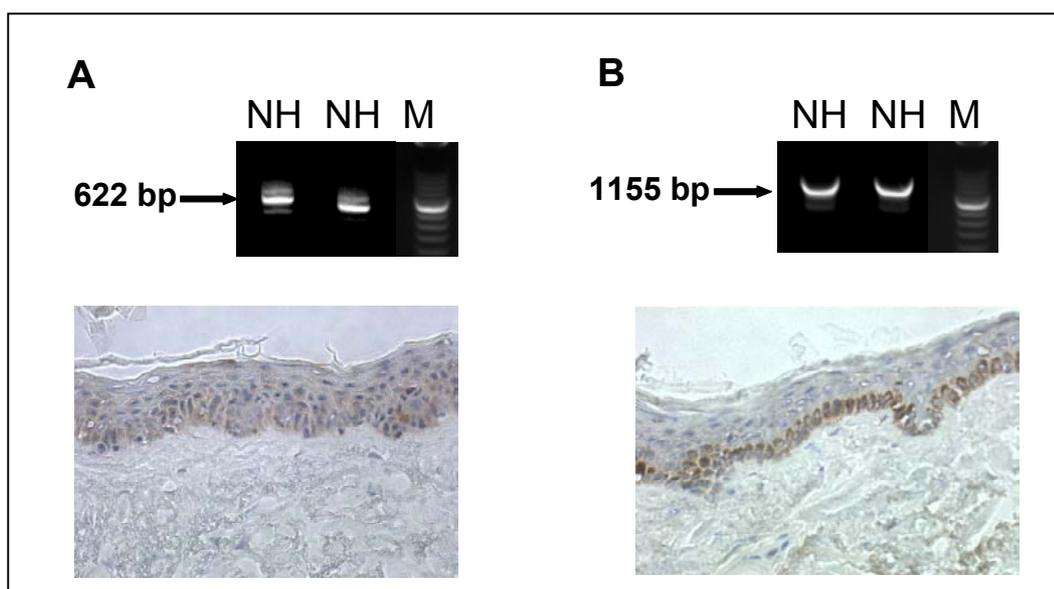


Abb. 27: Humane Haut exprimiert Makrophagen-stimulierendes Protein (MSP) und den Rezeptor „Recepteur d’origine nantais“ (RON). Aus Hautbiopsien wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR spezifische MSP- und RON-RNA Fragmente nachgewiesen. Die zelluläre Lokalisation des MSP- bzw. RON-Proteins erfolgte durch spezifische Antikörper in immunhistochemischen Analysen. **(A)** Es konnte mittels PCR in allen 4 untersuchten Hautgeweben (abgebildet sind die Ergebnisse von zwei Proben) MSP-mRNA detektiert werden. Eine starke Expression des MSP Proteins wurde in der Epidermis gefunden, während die Zellen der Dermis keine MSP Expression zeigten. **(B)** Die Expression der RON mRNA wurde ebenfalls in allen 4 untersuchten Hautproben gefunden (abgebildet sind die Ergebnisse von zwei Proben), wobei die Proteinexpression auf die Basalschicht des Keratinozytenlayers der Epidermis begrenzt war. Vergrößerung: 300x

Die Expression von MSP konnte in der Epidermis gesunder Haut lokalisiert werden, während die Dermis MSP-negativ ist (Abb. 27). Die Expression des RON-

Proteins beschränkte sich auf die Basalschicht des Keratinozytenlayers in der Epidermis. Somit konnte gezeigt werden, dass neben Hepatozyten (Ohshiro et al. 1996) auch Keratinozyten eine Quelle der endogenen MSP Produktion darstellen und den RON-Rezeptor exprimieren. Auch in kultivierten primären Keratinozyten konnte sowohl eine MSP als auch RON Expression auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). *In vivo* MSP-vermittelte Effekte werden nach proteolytischer Spaltung des im Blutplasma zirkulierenden pro-MSP durch eine Exoprotease in biologisch aktives MSP und die anschließende Bindung an den RON-Rezeptor der Zielzelle vermittelt (Morrison and Correll 2002). Da kultivierte Keratinozyten diesen Rezeptor exprimieren, konnten nun *in vitro* mit rekombinantem MSP die Effekte auf die Regulation der iNOS- und Arginase-1 Expression und Aktivität untersucht werden.

3.2.6. Regulation der iNOS in der Haut durch MSP

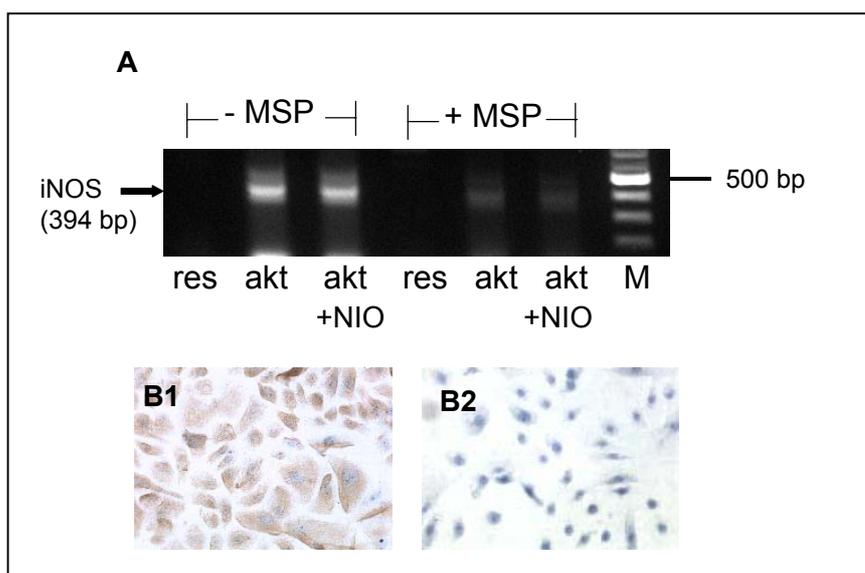


Abb. 28: MSP inhibiert die iNOS Expression in Keratinozyten. Humane Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 500 Units) und MSP (100ng/ml) sowie des spezifischen iNOS-Inhibitors NIO(250 μ M) für 24 Stunden kultiviert. RNA wurde aus 3×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR ein spezifisches iNOS mRNA-Fragment (**A**) detektiert. Durch spezifische Antikörper wurde die Expression des iNOS Proteins (**B**) bestimmt. Durch die Zytokinaktivierung kommt es in Keratinozyten zu einer *de novo* Expression der iNOS mRNA und des Proteins (**B1**). Die gleichzeitige Inkubation mit MSP führt zu einer starken Hemmung der iNOS mRNA und Protein Expression (**B2**). Vergrößerung: 640x

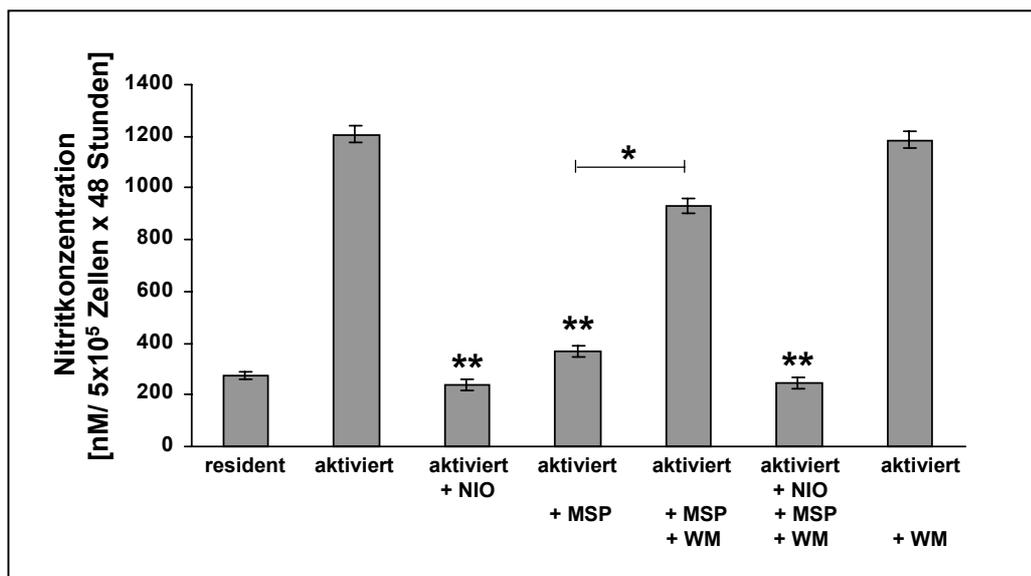


Abb. 29: Exogenes MSP inhibiert die iNOS-Aktivität in Keratinozyten, nicht aber endogenes MSP. Humane Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 500 Units) und MSP (100ng/ml) und der spezifischen Inhibitoren NIO (250 μ M) bzw. Wortmannin (100nM) aktiviert. Nach 24 Stunden wurden in den Zellkulturüberständen die Nitritkonzentration als Maß für die iNOS Aktivität bestimmt. Die Zytokinaktivierung bewirkt einen Anstieg der Nitritkonzentration um den Faktor 5, die durch NIO vollständig inhibiert werden kann. Die Inkubation mit MSP bewirkt eine Inhibition der iNOS Aktivität auf nahezu das Niveau der mit NIO inhibierten Zellen. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. **p < 0,001 und *p < 0,005

Die durchgeführten Untersuchungen zu den MSP-vermittelten Effekten auf die iNOS Expression und Aktivität zeigen einen stark hemmenden Effekt. In Gegenwart von 100ng/ml MSP wird die Zytokin-induzierte iNOS Expression auf mRNA Ebene nahezu vollständig inhibiert (Abb. 28 A) und auch iNOS Protein ist kaum noch detektierbar (Abb. 28 B2). Im Vergleich zu den Zytokin-aktivierten Zellen wurde die Enzymaktivität um ca. 70% gehemmt (Abb. 29). Diese MSP-modulierte Inhibition der iNOS Aktivität wird durch den spezifischen PI₃-Kinase Inhibitor Wortmannin, wieder aufgehoben. Die Zugabe von Wortmannin alleine aber bewirkt keinen Effekt auf die Enzymaktivität, so dass gefolgert werden muss, dass endogen produziertes MSP nicht in die biologisch aktive Form umgewandelt wird. Weitergehende Untersuchungen zum Einfluss von MSP auf die iNOS-Promotoraktivität sollten klären, in wieweit die MSP vermittelten Effekte auf dieser Ebene von der Zytokinkonzentration abhängig sind.

3.2.7. MSP hemmt die iNOS-Expression auf der transkriptionellen Ebene

Die MSP-abhängige Hemmung der Promotoraktivität ist abhängig von der Zytokinkonzentration. Eine Aktivierung mit je 100 U/ml der drei Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ führt zu einer Erhöhung der Promotoraktivität um den Faktor 4 die durch MSP (100 ng/ml) um 48% inhibiert wird. Die Aktivierung mit höheren Zytokinkonzentrationen bewirkt einen höheren Anstieg der Promotoraktivität Faktor 7,1 bei je 500 U/ml bzw. 7,9 bei 1000 U/ml. Diese hohe Aktivität kann durch MSP nur noch in geringem Maße (29% bei 500 U/ml und 19% bei 1000 U/ml) gehemmt werden. Alle inhibitorischen Effekte des MSP können durch Wortmannin wieder aufgehoben werden.

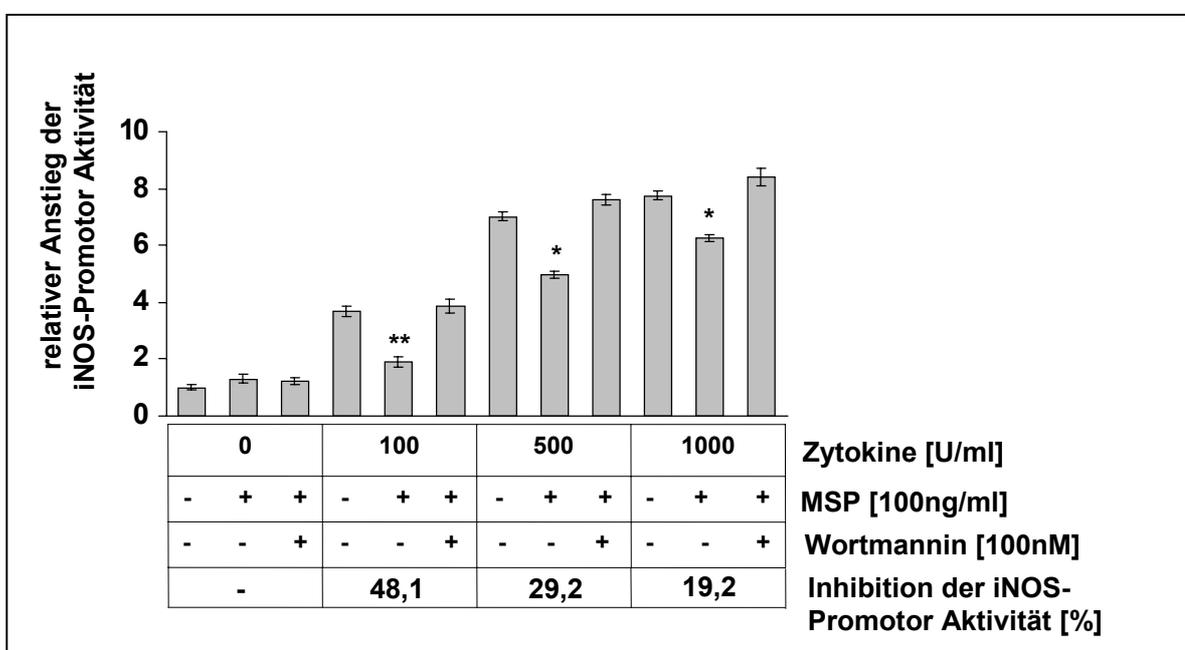


Abb. 30: MSP inhibiert die iNOS-Promotoraktivität. A549/8 Zellen, stabil transfiziert mit einem 16 kb Fragment der 5'-Region des humanen iNOS Gens, wurden in An- und Abwesenheit von unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ), MSP (100 ng/ml) und Wortmannin (100nM) kultiviert. Die Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der iNOS-Promotoraktivität, welche durch MSP inhibiert wird. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,01$ und **, $p < 0,005$

Zusammenfassend zeigen die *in vitro* Untersuchungen der MSP-vermittelten Effekte, dass exogenes MSP einen inhibitorischen Effekt auf die Expression und Aktivität die iNOS in Keratinozyten ausübt, der selbst in Gegenwart hoher Zytokinkonzentrationen noch einen effektiven Modulationsmechanismus darstellt.

3.2.8. Effekte von MSP auf die Expression und Aktivität von CAT-2 und Arginase-1

Da die Substratversorgung und Arginase-1 Expression ebenfalls effektive Modulatoren der iNOS Aktivität sind, wurden im folgenden die Effekte von MSP auf die CAT-Expression und Arginase Aktivität untersucht.

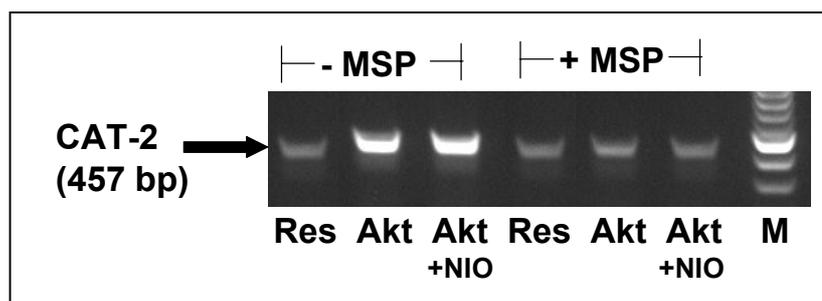


Abb. 31: MSP inhibiert die Zytokin-induzierte CAT-2 mRNA Expression in Keratinozyten. Humane Keratinozyten wurden in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 500 Units) und MSP (100ng/ml) und des spezifischen iNOS-Inhibitors NIO(250 μ M) für 24 Stunden kultiviert. RNA wurde aus 3×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR ein spezifisches CAT-2 mRNA-Fragment detektiert.

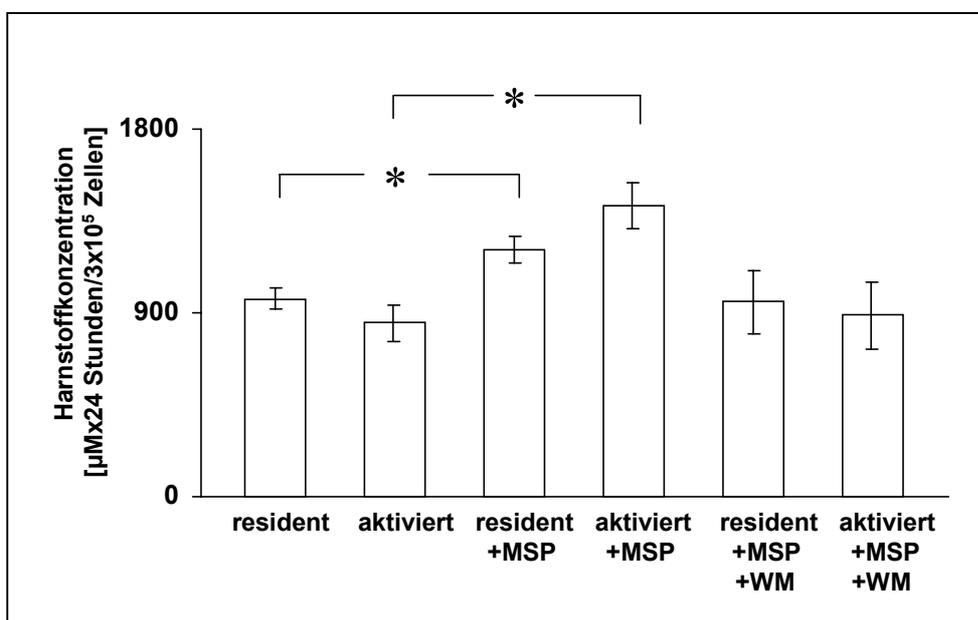


Abb. 32: MSP steigert die Arginaseaktivität in Keratinozyten. Residente und aktivierte (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) Keratinozyten wurden für 24 Stunden in An- und Abwesenheit von MSP (100ng/ml) und Wortmannin (100nM) kultiviert. Die Arginase-Aktivität wird durch MSP um ca. 30% gesteigert, wobei dieser Effekt durch Wortmannin spezifisch gehemmt werden kann. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *p < 0,02

Die MSP-vermittelte iNOS Inhibition ist begleitet von zwei weiteren Effekten für den L-Arginin Metabolismus in Keratinozyten: Zum einen ist die CAT-2 Expressionsverstärkung nach Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen in Anwesenheit von MSP gehemmt (Abb. 31) was eine verminderte Substratversorgung für die iNOS bzw. Arginase zur Folge hat. Zum anderen wird eine moderat erhöhte Arginase-1 Expression (Daten nicht gezeigt) und eine erhöhte Arginase-Aktivität in Anwesenheit von MSP gefunden (Abb. 32). Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass bioaktives MSP ein wichtiger Regulator des L-Arginin Metabolismus in Zytokin-aktivierten humanen Keratinozyten ist, wobei das endogen produzierte MSP bei keiner der durchgeführten Untersuchungen einen Effekt zeigte. Die MSP-vermittelte iNOS-Inhibition erfolgt also auf zwei unterschiedlichen Ebenen: Zum einen bewirkt MSP einen direkten, inhibitorischen Effekt auf den iNOS-Promotor. Zum anderen wird die Arginase-1 Aktivität moderat erhöht (Abb. 32). Aufgrund dieser *in vitro* Ergebnisse, die einen wichtigen Beitrag des MSP für die Regulation des L-Arginin Transports und Metabolismus in Keratinozyten zeigen, wurde im folgenden ein möglicher Einfluss der MSP und RON Expression in der Pathophysiologie der Psoriasis untersucht.

3.2.9. Expression von MSP und RON in Psoriasis-Patienten

Die Expression von MSP und RON in Psoriasis-Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auf eine mögliche differentielle Genexpression hin untersucht.

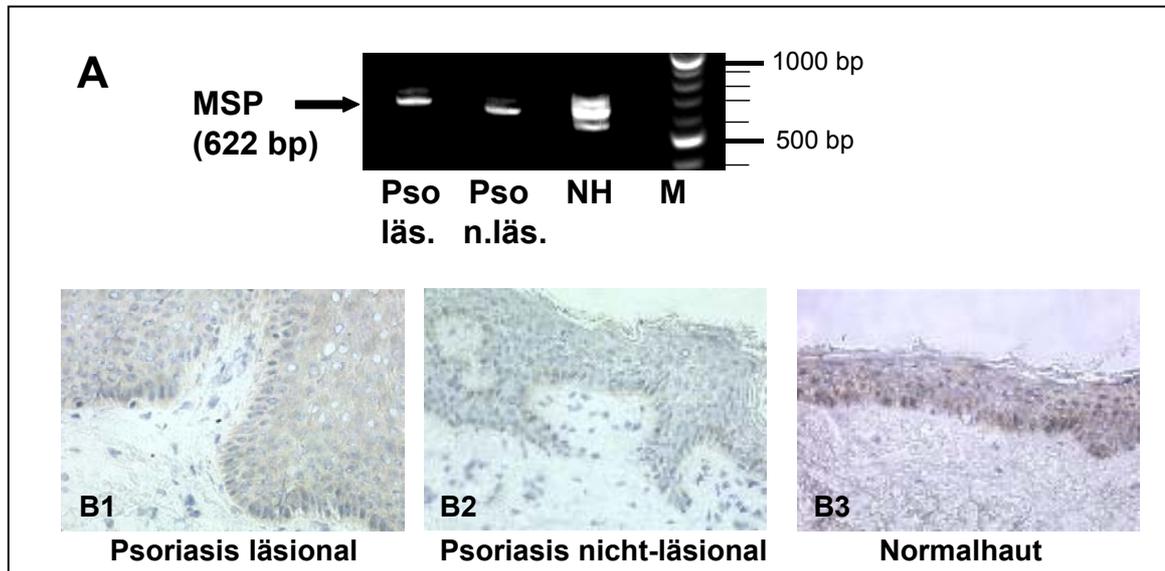


Abb. 33: Verminderte MSP-Expression in Hautbiopsien von Patienten mit Psoriasis.

(A) Aus Hautgewebe wurde RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Mittels spezifischer Primer wurde die MSP-Expression analysiert. Dargestellt sind die Expressionsanalysen einer repräsentativen Analyse einer läsionalen Psoriasisprobe (Pso läs.), einer nicht läsionalen Psoriasisprobe (Pso n. läs.) und Hautproben eines gesunden Probanden (NH). Insgesamt wurden 5 läsionale, 3 nicht läsionale und 5 Hautproben gesunder Probanden untersucht. Die MSP mRNA (622 bp) ist sowohl in läsionalen als auch nicht läsionalen psoriatischem Gewebe geringer exprimiert als in den Hautproben des gesunden Probanden. (B) Die immunhistochemische Lokalisation in den Hautbiopsien zeigte sowohl eine MSP-Protein Expression in den epidermalen Keratinozyten der psoriatischen Gewebe (B1 und B2) als auch in der Normalhaut (B3). Vergrößerung: 300x

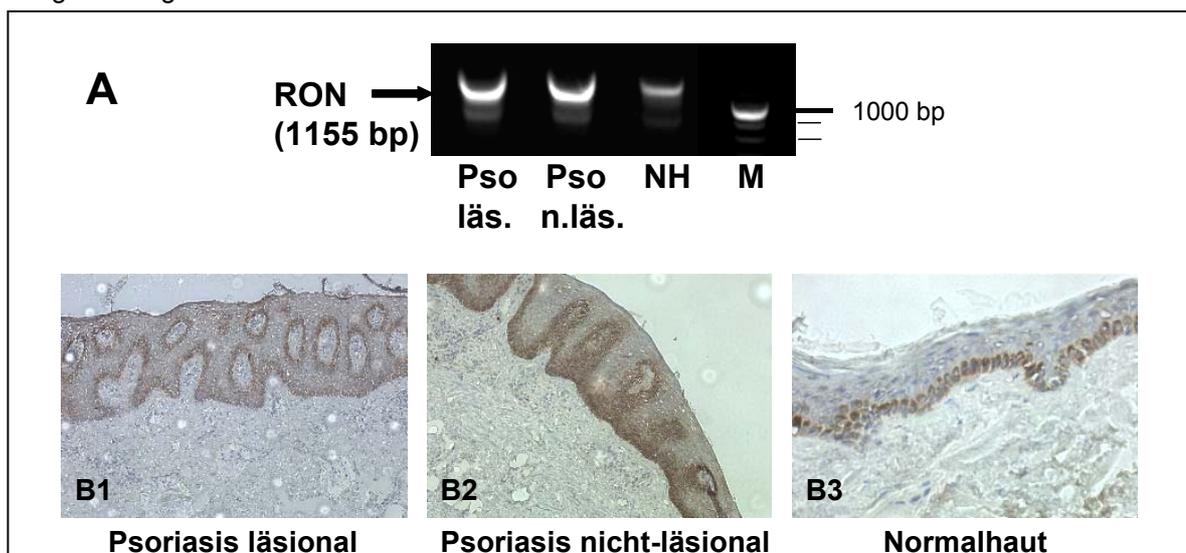


Abb. 34: Überexpression des RON-Rezeptors in psoriatischer Haut. In den identische Proben aus Abbildung 32 wurde die RON Expression mit den gleichen Methoden analysiert. Sowohl auf mRNA Ebene (A) als auch auf Proteinebene (B) wurde eine starke Überexpression des Rezeptors sowohl in den läsionalen (B1) als auch nicht läsionalen (B2) Psoriasis Biopsien verglichen mit gesunden Probanden (B3) gefunden. Vergrößerung: 160x (B1, B2) und 300x (B3)

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen eine moderat verminderte MSP Expression (Abb. 33) und gleichzeitig eine sehr starke Überexpression des RON Rezeptors im psoriatischen Gewebe (Abb. 34). Diese Überexpression des RON Rezeptors in psoriatischer Haut könnte funktionelle Bedeutung für die Regulation des Arginin-Stoffwechsels haben und steht im Einklang mit einer Publikation, die eine Überexpression des RON-Rezeptors in akuten Wunden zeigt (Nanney et al. 1998). Die RON Überexpression in psoriatischer Haut könnte der molekulare Mechanismus für die Arginase-1 Überexpression sein und auch die geringe NO-Synthese in psoriatischer Haut erklären.

3.2.10. Erhöhte MSP-Konzentrationen in den Seren von Psoriasis-Patienten

Abschließend wurde die MSP-Konzentration im Serum von Psoriasis-Patienten bestimmt, um zu überprüfen, ob eine systemische Veränderung der MSP-vermittelten Signaltransduktion vorliegt.

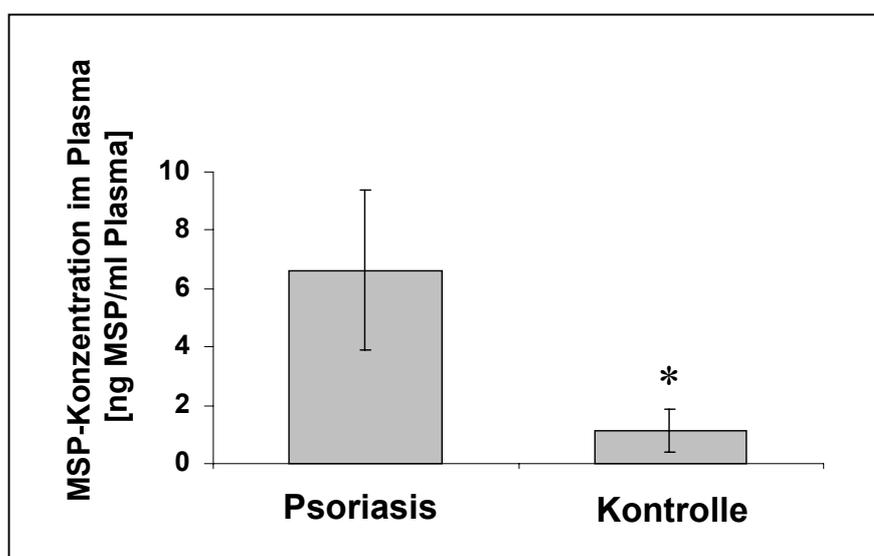


Abb. 35: Stark erhöhte MSP-Spiegel im Serum von Psoriasis-Patienten. Die MSP-Konzentration im Serum von 11 Psoriasispatienten und von 13 gesunden Kontrollpersonen wurde mittels Sandwich-ELISA quantifiziert. Angegebenen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,02$

Die Analyse der Seren zeigte, eine signifikant erhöhte MSP-Konzentration in den Psoriasis-Patienten, die auf eine funktionelle Beteiligung des MSP/RON Signalwegs in der Pathogenese der Psoriasis hindeuten. Somit konnte neben der

Überexpression der Arginase-1, die möglicherweise den limitierenden Faktor für die iNOS Aktivität in psoriatischen Keratinozyten darstellt, mit der Beteiligung des MSP/RON Signalwegs ein molekularer Mechanismus aufgezeigt werden, der die Arginase-1 Überexpression in psoriatischer Haut erklären kann und weiterreichende Konsequenzen für die Steuerung von Proliferation und Differenzierung psoriatischer Keratinozyten haben könnte.

3.3. Effekte therapeutischer UV-A Dosen auf den L-Arginin-Metabolismus in der Haut

Die Exposition der Haut mit UV-A Strahlung kann eine Vielzahl von Reaktionen wie z.B. Entzündungen, Immunsuppression, Erythembildung und Hautkrebs verursachen (Deliconstantinos et al. 1995; Kuhn et al. 1998) sowie direkt zur Expression der iNOS in Hautzellen führen. Andererseits wird UV-A Strahlung auch therapeutisch bei der Behandlung von Psoriasis-Patienten genutzt. Da einige UV-A mediierte Effekte auch über die Aktivität der iNOS vermittelt werden könnten, wurden die Effekte der UV-A Strahlung auf den L-Arginin-Metabolismus in Haut bzw. Hautzellen untersucht. Dazu wurde zuerst die toxische Wirkung von UV-A Strahlung auf Keratinozyten analysiert. Keratinozyten wurden mit unterschiedlichen UV-A Intensitäten bestrahlt und der Anteil der apoptotischen und lebenden Zellen quantifiziert. Zur Vermeidung von UV-Absorption durch Inhaltsstoffen der Zellkulturmedien wurde die Bestrahlungen von Geweben und Zellen in PBS durchgeführt.

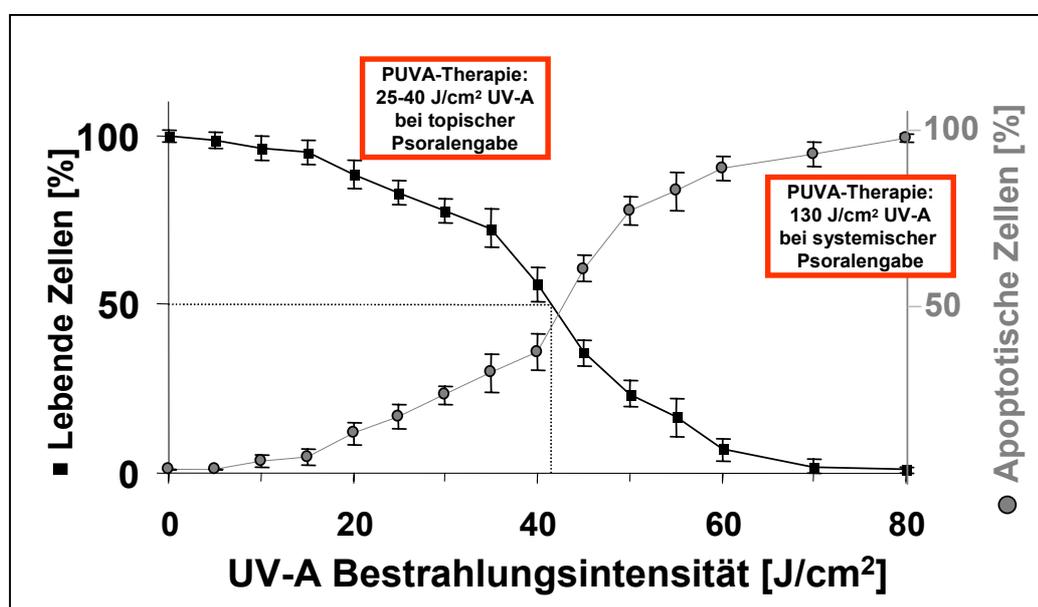


Abb. 36: UV-A Bestrahlung von primären Keratinozyten führt zum Zelltod durch Apoptose. Residente Keratinozyten wurden mit unterschiedlichen Dosen UV-A Licht bestrahlt. Nach 24 Stunden wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels des Vitalfarbstoffs Trypanblau und die Anzahl apoptotischer Zellen mittels DNA-Färbung (Höchst 33342) quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Die Auswertung der Dosis-Wirkungskurve ergibt, dass die LD_{50} für die UV-A induzierte Apoptose in Keratinozyten bei einer Bestrahlungsintensität von 42 J/cm^2 liegt. Um für die weiteren Untersuchungen zu gewährleisten, dass die gewählten Bestrahlungsintensitäten zwischen 0 und 20 J/cm^2 keine oder nur einen geringen Anteil apoptotischer Zellen zur Folge haben, wurde zusätzlich eine in situ nick Translation zum Nachweis von UV-A induzierten DNA-Strangbrüchen durchgeführt.

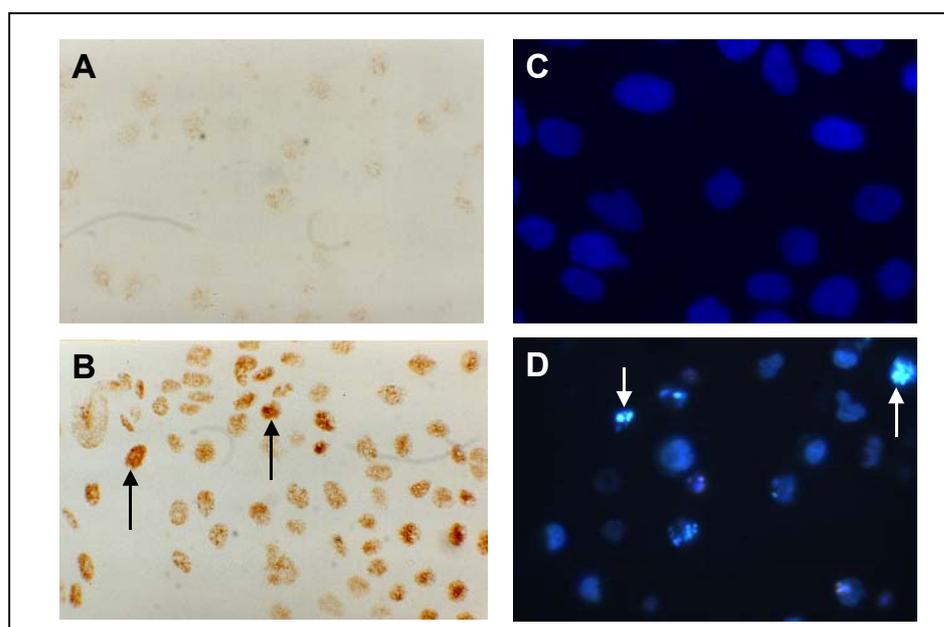


Abb. 37: Hohe Intensitäten von UV-A Strahlung führen zu DNA-Strangbrüchen. Residente Keratinozyten wurden mit 20 und 55 J/cm^2 UV-A Licht bestrahlt. Nach 24 Stunden wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels in situ nick Translation quantifiziert. Während die mit 20 J/cm^2 bestrahlten Keratinozyten keine Strangbrüche aufweisen (**A**), sind die für apoptotische Zellen charakteristischen DNA-Strangbrüche in den mit 55 J/cm^2 bestrahlten Zellen (**B**) durch eine intensive Braunfärbung deutlich zu erkennen. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde mittels eines DNA-Farbstoffs (Hoechst 33342) quantifiziert (siehe Abb E.26). Exemplarisch sind mit 20 J/cm^2 (**C**) und 55 J/cm^2 bestrahlte Zellen (**D**) abgebildet. Während bestrahlte Zellen die für apoptotische Zellen charakteristische Fragmentierung der Zellkerne zeigen, sind diese Stadien in unbestrahlten Zellen nicht zu finden. Vergrößerung: $300\times$ (A, B) und $640\times$ (C,D)

Die Auswertung der Untersuchungen zeigt, dass bei Dosen bis zu 25 J/cm^2 weniger als 15% apoptotische Zellen gefunden wurden und daher bei diesen Bestrahlungsintensitäten UV-A induzierte Effekte in zufriedenstellenderweise untersucht werden konnten. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Methoden zur Detektion von UV-A induzierter Apoptose bestand ein hohes Maß an Sicherheit, dass bei diesen Bestrahlungsintensitäten die Ergebnisse nicht durch Apoptose-induzierte-Effekte beeinträchtigt werden. Die Evaluierung der UV-A medierten Effekte auf die Expression und Aktivität von iNOS und Arginase

wurde auch in Zellkulturversuchen mit primären Keratinozyten analysiert. Dazu wurden die Zellen mit nicht-toxischen Dosen (20 J/cm^2) UV-A bestrahlt und anschließend für 24, 48 oder 96 Stunden in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine kultiviert und anschließend sowohl die Genexpression als auch die Enzymaktivität von iNOS und Arginase bestimmt.

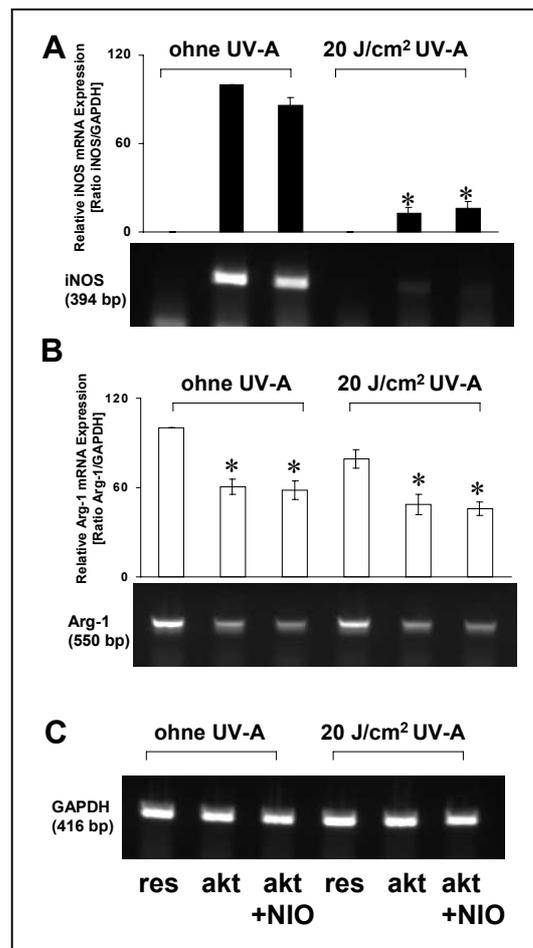


Abb. 38: UV-A hemmt die Zytokin-induzierte iNOS Expression in Keratinozyten. Um den Effekt von UV-A Strahlung auf die Expression der beteiligten Proteine des L-Arginin-Metabolismus zu untersuchen, wurden Keratinozyten mit 0 und 20 J/cm^2 UV-A bestrahlt und anschließend 24 Stunden lang in An- und Abwesenheit von Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 100 Units) und des spezifischen iNOS-Inhibitors NIO kultiviert. Anschließend wurde die RNA aus 3×10^5 Zellen isoliert und mittels RT-PCR spezifische Fragmente von iNOS (**A**), Arginase-1 (**B**) und GAPDH (**C**) detektiert und auf die GAPDH normiert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3). *p < 0,02

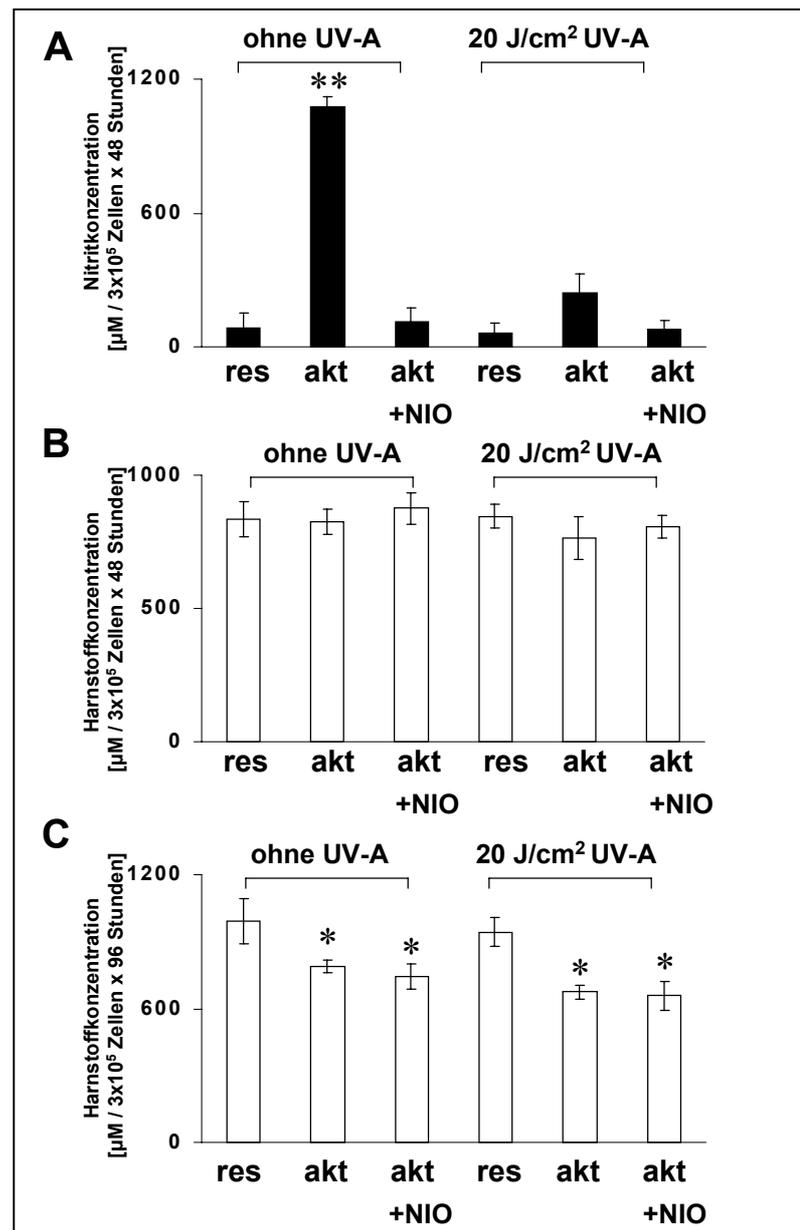


Abb. 39: UV-A hemmt die Zytokin-induzierte iNOS Aktivität in Keratinozyten. Um den Effekt von UV-A Strahlung auf die iNOS- (A) und Arginase-Aktivität (B,C) zu untersuchen, wurden Keratinozyten mit 0 und 20 J/cm² UV-A bestrahlt und anschließend 24 (B), 48 (A) oder 96 (C) Stunden lang in An- und Abwesenheit von Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 100 Units) und des spezifischen iNOS-Inhibitors NIO kultiviert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Enzymaktivität durch Enzymassays quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3). *p < 0,02 und **p < 0,005

Die Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen bewirkt eine iNOS-Induktion (Abb. 38 A), was einen starken Anstieg der Enzymaktivität zur Folge hat (Abb. 39 A). Die UV-A Bestrahlung der Zellen bewirkt in Abwesenheit von Zytokinen keine iNOS Induktion bzw. Enzymaktivität. In Verbindung mit Zytokinen bewirkt die UV-A Strahlung eine nahezu vollständig Hemmung der Zytokin-vermittelten iNOS-Induktion und Aktivität, denn es wird nur noch eine sehr schwache iNOS mRNA Expression und eine um $85 \pm 7\%$ verminderte Aktivität gemessen. Auch die

Arginase-1 mRNA Expression wird durch proinflammatorische Zytokine inhibiert und in Folge der UV-A Bestrahlung wird die Zytokin-induzierte Hemmung weiter verstärkt, so dass die Arginase-1 Expression in den bestrahlten Zellen 10 - 20% unter dem Niveau der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle lag. Es zeigte sich, dass residente, bestrahlte Zellen ein Arginase-1 Expressionsniveau von $84 \pm 5\%$ im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen aufwiesen. Während nach 48 Stunden keine Änderung der Arginase-Aktivität gemessen wurde (Abb. 39 B), zeigte sich nach 96 Stunden in Übereinstimmung mit vorher durchgeführten Versuchen eine moderate, aber dennoch signifikant erniedrigte Arginase-Aktivität in den aktivierten Zellen (Abb. 39 C), die allerdings durch UV-A Strahlung nicht weiter signifikant verringert wurde. Zur weiteren Charakterisierung wurde der Effekt von UV-A Strahlung auf den iNOS-Promotor in An- und Abwesenheit von Zytokinen in der bereits beschriebenen Modell-Zelle untersucht.

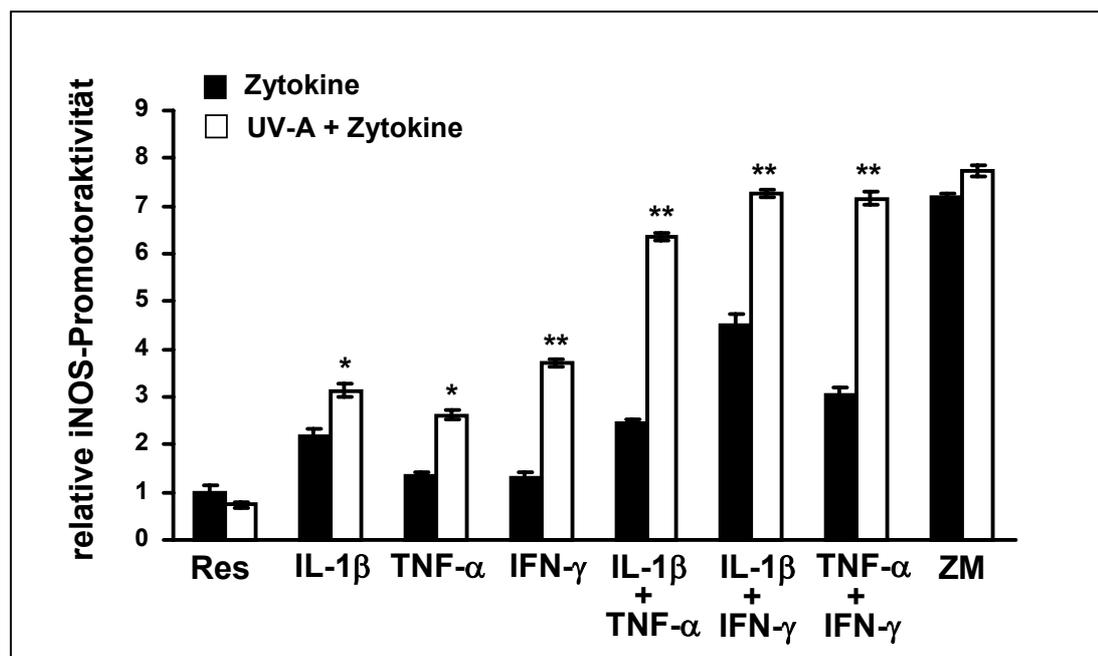


Abb. 40: UV-A Bestrahlung bewirkt eine Erhöhung der Zytokin-induzierten Aktivierung des iNOS-Promotors. Um den Effekt von UV-A Strahlung auf die Aktivität des iNOS Promotors zu untersuchen, wurden A549/8 Zellen mit einem 16-kb Fragment der 5'-Sequenz des humanen iNOS Gen stabil transfiziert. Dazu wurden die Zellen mit UV-A Licht [20 J/cm²] bestrahlt (leere Balken) und anschließend in Anwesenheit von einzelnen Zytokinen oder Zytokinkombinationen (IL-1β, TNF-α und IFN-γ, jeweils 500 Units) für 8 Stunden kultiviert. Die Kontrollen wurde ohne UV-A Bestrahlung (schwarze Balken) nur in Gegenwart von Zytokinen kultiviert. Während UV-A allein keinen Effekt zeigte, führte die Inkubation mit einzelnen Zytokinen ohne UV-A nur im Falle des IL-1β zu einer Erhöhung der Aktivität um den Faktor 2,3. In den UV-A bestrahlten Zellen mit einzelnen Zytokinen wurde eine signifikante Erhöhung der Promotoraktivität, im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen gemessen. Die Kombination von zwei Zytokinen führt zu einer weiteren Steigerung der Promotoraktivität welche durch die Kombination mit UV-A in allen untersuchten Kombinationen maximal wird. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,005$ und **, $p < 0,001$

Im Gegensatz zu den durchgeführten Untersuchungen an Keratinozyten, bewirkt die UV-A Bestrahlung in Zytokin-aktivierten Zellen eine Verstärkung der iNOS-Promotoraktivität, wenn die Aktivierung mit einem einzelnen oder einer Kombination von zwei Zytokinen durchgeführt wurde. So führt IFN- γ allein zu keiner signifikanten Veränderung der Promotoraktivität, doch in Kombination mit UV-A Bestrahlung wird eine Erhöhung der Aktivität um den Faktor 3,2 gefunden. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Verwendung von Zweier-Kombinationen von Zytokinen, die eine UV-A induzierte Verdopplung der Aktivität zur Folge haben. Die maximale Promotoraktivität ohne UV-A Bestrahlung, wird durch den Zytokinmix (ZM), einer Kombination aller drei verwendeten Zytokine, gemessen. In diesem Fall ist die Aktivität durch UV-A Bestrahlung nicht weiter zu steigern.

Um die Wirkung von UV-A Strahlung auf die Expression relevanter Moleküle des Arginin-Metabolismus in der Haut *ex vivo* zu untersuchen, werden Kurzzeit-Organokulturen mit 25 J/cm² UV-A bestrahlt und dann in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine für 24 Stunden kultiviert. Durch die Isolation von Gesamt-RNA können die Effekte der UV-Bestrahlung auf die Genexpression in der Haut mittels RT-PCR quantifiziert werden.

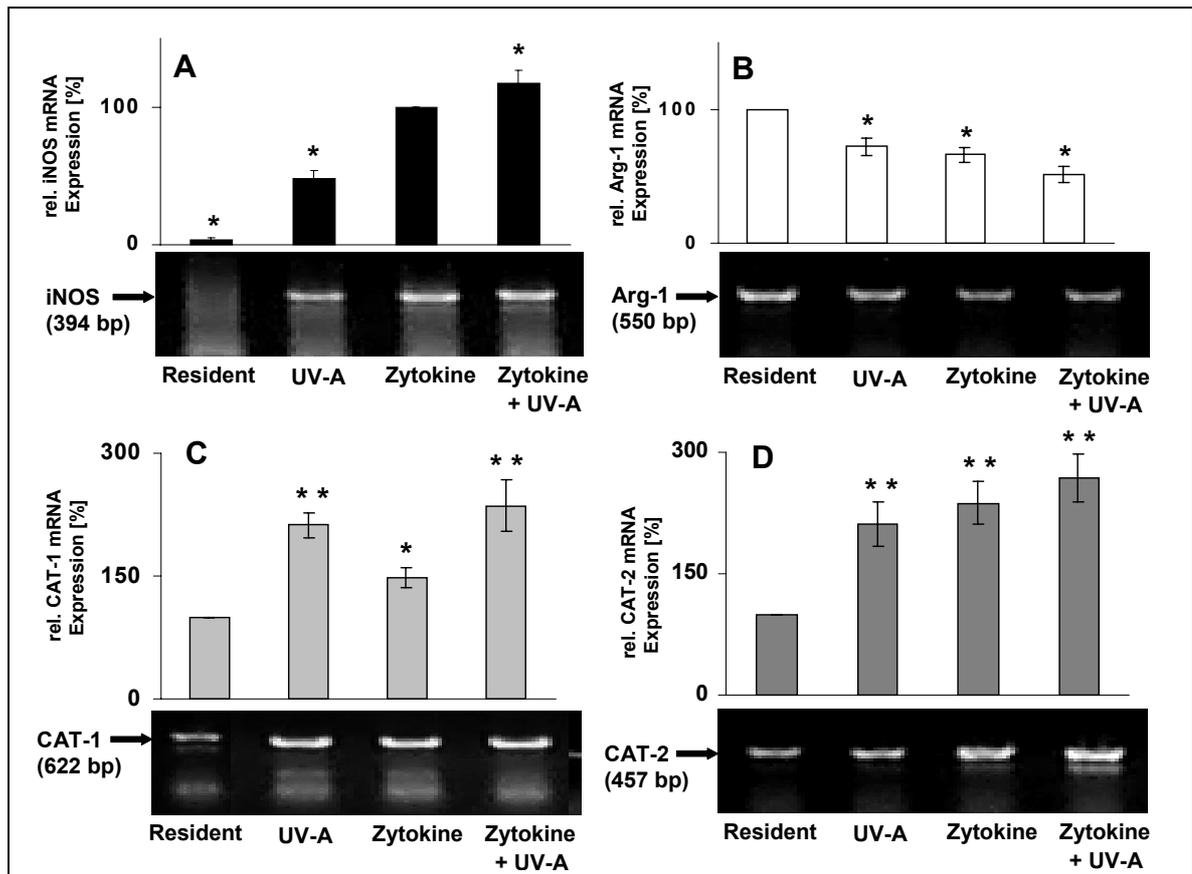


Abb. 41: Sowohl UV-A Bestrahlung als auch proinflammatorische Zytokine führen zur *de novo* Expression von iNOS mRNA in humaner Haut, während gleichzeitig die Expression der Arginase-1 mRNA reduziert wird. Kurzzeit-Organokulturen humaner Haut wurde in An- und Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jeweils 1000 Units) und/oder UV-A Bestrahlung (25 J/cm²) 24 Stunden lang kultiviert. Anschließend wurde aus dem Gewebe Gesamt-RNA isoliert und RT-PCR Analysen durchgeführt. Mittels spezifischer Primer wurde die mRNA Expression der iNOS (A), Arginase-1 (B), CAT-1 (C) und CAT-2 (D) quantifiziert. Zur Kontrolle wurde die Expression auf das „house-keeping“ Gen GAPDH normiert. Dargestellt sind die Expressionsanalysen eines repräsentativen Experiments (n = 3). Sowohl proinflammatorische Zytokine als auch UV-A Bestrahlung führen zur Induktion der iNOS, wobei die Induktion durch Zytokine stärker ist als durch UV-A alleine. Eine Kombination von UV-A und Zytokinen führt zu einem moderat synergistischen Effekt. Während die Zytokin- und UV-A Aktivierung der Haut gleichzeitig zu einer Erhöhung der CAT-1 und CAT-2 Expression führt, wird im Gegensatz dazu die Expression der Arginase-1 signifikant reduziert. Angegebenen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. *p < 0,05 und **p < 0,02

Die UV-A Bestrahlung humaner Kurzzeit-Organokulturen hat eine *de novo* Expression der iNOS mRNA zur Folge, die allerdings nur $54 \pm 4\%$ des Niveaus der Zytokin-induzierten Expression erreicht. Sowohl UV-A Bestrahlung ($72 \pm 5\%$) als auch proinflammatorische Zytokine ($65 \pm 5\%$) bewirken eine Abnahme der Arginase-1 mRNA, wobei die Kombination beider Stimuli die stärkste Hemmung auf $49 \pm 6\%$ relativ zum residenten Niveaus bewirkt. Die inverse Regulation der Expression von iNOS und Arginase-1 wird begleitet von einem signifikanten Anstieg der Expression beider CAT-Transporter, so dass zusammenfassend in

Hautorgan-Kulturen eine UV-A induzierte iNOS-Expression gefunden wird, die gleichzeitig von einer Repression der Arginase-1 mRNA und einem Anstieg in der Expression beider CAT-Transportsysteme begleitet wird. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen einen direkten Effekt von UV-A Strahlung auf die iNOS-Induktion in der Haut und die Substratversorgung.

4. Diskussion

4.1. Wie viel NO entsteht in den Läsionen von Psoriasis-Patienten *in vivo* ?

Die Hyperproliferation epidermaler Keratinozyten in der Psoriasis ist ein komplexes Phänomen, welches durch viele Faktoren beeinflusst werden kann. Das multifunktionale Signalmolekül NO scheint eine zentrale Rolle einzunehmen. NO ist mittlerweile als ein wichtiger Regulator entzündlicher Prozesse und steuert die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten über einen biphasischen Effekt (Krischel et al. 1998). Während geringe NO-Konzentrationen die Proliferation stimulieren, wird durch hohe NO-Konzentrationen die Differenzierung induziert. Somit steht die „konstitutive“ iNOS-Expression, verbunden mit potentiell hohen lokalen NO-Konzentrationen und den damit einhergehenden antiproliferativen Eigenschaften von NO im Widerspruch zur tatsächlich beobachteten, charakteristischen Hyperproliferation psoriatischer Keratinozyten. Die direkte Messung von gasförmigen NO über der Haut ist nicht nur mit großen experimentellen Schwierigkeiten verbunden, sondern die vorhandenen Daten (Ormerod et al. 1998) sind aufgrund einer Vielzahl von Variablen, wie z.B. Reaktionen mit anderen Molekülen entlang der Diffusionsstrecke durch die Haut sowie der Aktivität anderer NO-Synthasen, vorsichtig zu bewerten. Die von Ormerod und Weller publizierten Ergebnisse zeigen zwar signifikant erhöhte Nitritmengen über psoriatischen Läsionen im Vergleich zu gesunder Haut, die kein iNOS-Protein exprimieren, dennoch konnte nicht geklärt werden, ob die gebildeten NO-Konzentrationen *in vivo* für einen antiproliferativen Effekt ausreichend sind oder nur niedrigen, proliferationsstimulierenden NO-Konzentrationen entsprechen. Daher wurde zur Überprüfung der Hypothese einer limitierten *in vivo* iNOS Aktivität eine indirekte Methode gewählt. Die Reaktion von NO mit SH-Gruppen von Cystein-Resten führt zur Bildung von S-Nitrosocysteiny-Resten. Durch immunhistochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass in psoriatischer Haut diese Verbindungen nicht zu detektieren waren (Abb. 24), im Gegensatz zu gesunder Haut und Kurzzeit-Organokulturen, die mit Zytokinen und/oder NO-Donoren behandelt waren. Dies ist zwar nur ein indirekter Beleg einer fehlenden bzw.

erniedrigten iNOS-Aktivität, stützt aber die Hypothese, dass ein Versagen in der high-output NO-Synthese trotz iNOS-Expression zur Pathogenese der Psoriasis beiträgt. Durch *in vitro* Untersuchungen an kultivierten, humanen Keratinozyten wurden verschiedene Modulationsmöglichkeiten der iNOS-Aktivität wie L-Arginin-Transport, Feedback-Mechanismen und Substratkompetition untersucht um zu einer Erklärung für dieses „iNOS/Psoriasis-Paradoxon“ zu gelangen.

4.2. Relevanz des L-Arginin Transport in der humanen Haut

Der L-Arginin-Transport ist in vielen Zellen und Geweben an der Regulation der NO-Synthese beteiligt (Deves and Boyd 1998). Durch den vielfältigen Einfluss von NO auf die Proliferation, Differenzierung, Wundheilung und Genexpression in der Haut (Bruch-Gerharz et al. 1998) stellt die Regulation der iNOS-Aktivität einen entscheidenden Parameter der Homöostase der Haut dar. Daher wurden *in vitro* und *ex vivo* Experimente mit Hautbiopsien, Kurzzeit-Organokulturen und Zellkulturen primärer Hautzellen und Zelllinien durchgeführt, um mehr Informationen über die Bedeutung des L-Arginin-Transports für die iNOS Regulation zu erhalten. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl CAT-1 und als auch CAT-2 mRNA in Hautbiopsien gesunder Probanden exprimiert sind (Abb. 16). Während die CAT-1 Expression durch die beschriebene ubiquitäre Expression in den meisten Zellen und Geweben (Closs and Mann 1999) erwartet wurde, war die CAT-2 Expression in gesunder, unbehauelter Haut überraschend, da diese Isoform in der Regel nur nach inflammatorischen Stimuli exprimiert wird. Bekannt war bisher die konstitutive CAT-2 Expression nur in glatten Muskelzellen (Durante et al. 1996) und Hepatozyten (Closs et al. 1997). Um den zellulären Ursprung der konstitutiven CAT-2 Expression in der Haut beschreiben zu können, wurde im nächsten Schritt die Expression der CAT Isoformen in den dominanten Zelltypen der Haut analysiert (Abb. 17) und die Funktionalität ihrer Expression untersucht. Dabei wurde eine konstitutive CAT-1 Expression wie erwartet in allen untersuchten Zellen gefunden. In Keratinozyten und der Zelllinie HaCat war die Expression der CAT-1 mRNA nach Zytokinaktivierung erhöht. Dieser Expressionsanstieg war ein interessantes Ergebnis, denn damit konnte eine transkriptionelle

Beteiligung an der Regulation der CAT-1 Expression gezeigt werden, von der bisher ausschließlich Mechanismen auf translationaler und post-translationaler Ebene bekannt sind (Aulak et al. 1999). Die konstitutive CAT-2 mRNA Expression wurde in residenten Keratinozyten und dermalen Endothelzellen gefunden, wobei in beiden Zelltypen die Expression nach Zytokin-Gabe stark ansteigt, während in HaCat und Fibroblasten erst nach Zytokinaktivierung eine *de novo* Synthese von CAT-2 mRNA zu sehen ist. Somit konnte gezeigt werden, dass das in den Hautbiopsien in Abwesenheit von Zytokinen detektierte Signal der CAT-2 Expression nicht durch alle Zellen der Haut, sondern nur durch Endothelzellen und Keratinozyten generiert wird. Die CAT-2 Expression in residenten Zellen könnte ein gemeinsames Charakteristikum derjenigen Zellen (Hepatozyten, Keratinozyten und Endothelzellen) sein, welche auch die Arginase-1 resident exprimieren, um einen erhöhten L-Arginin Bedarf Rechnung zu tragen. Die CAT-2 Induktion wird von einer Ko-Expression der iNOS begleitet, wobei die schnellere Kinetik der CAT-2 Expression (Abb. 18) einen wichtigen Parameter in der zeitlichen Abfolge zur effizienten NO-Synthese darstellen könnte. Die Expression von iNOS und CAT-2 ist über einen NF- κ B mediierten Signalweg beschrieben (Hammermann et al. 2000), welcher die koordinierte Expression beider Gene gewährleistet.

4.3. Bedeutung der CAT-Expression für die Regulation der iNOS- und Arginase-Aktivität

Um den Einfluss des CAT-medierte L-Arginin Transport auf die iNOS Aktivität zu untersuchen, wurden Keratinozyten in Gegenwart hoher Konzentrationen anderer kationischer Aminosäuren kultiviert, die mit L-Arginin um den Transport in die Zelle konkurrieren (Abb. 19). Die Supplementierung des Kulturmediums mit L-Lysin oder einer Kombination von L-Lysin und L-Ornithin führt zu einer erniedrigten iNOS Aktivität von $56 \pm 4\%$ bzw. $21 \pm 5\%$ relativ zur Kontrolle, während L-Ornithin alleine keinen inhibitorischen Effekt zeigt, was auf einen erhöhten K_m -Wert und damit eine verminderte Transportaffinität für L-Ornithin in Keratinozyten schließen lässt, was bereits in Oozyten gezeigt werden konnte (Wang et al. 1991). Dieses Ergebnis belegt die Notwendigkeit der CAT-medierte L-Arginin Aufnahme, um in Keratinozyten eine

ausreichende Substratversorgung für eine maximale iNOS Funktion zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu wird die Arginase-Aktivität (Abb. 20) durch L-Ornithin oder die Kombination von L-Ornithin und L-Lysin um über 90% gehemmt, während L-Lysin die Aktivität nur um 30% hemmt. Dieser Effekt lässt sich durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklären: Während der L-Ornithin vermittelte Effekt in erster Linie auf eine Produkthemmung der Arginase zurückzuführen sein dürfte, sollte aufgrund der geringeren Affinität des L-Ornithin zum CAT Transporter der verminderte L-Arginin Transport nur von untergeordneter Bedeutung sein. Im Gegensatz dazu ist der hemmende Effekt des L-Lysin durch eine effektive Konkurrenz zu erklären. Dies hat nicht nur einen verminderten Transport von L-Arginin in die Zelle, sondern auch den Austausch von intrazellulärem L-Arginin gegen das in die Zelle transportierte L-Lysin zur Folge (Ahmed and Van Den Oord 1999; Closs et al. 2000). Kürzlich wurde der L-Arginin Transport und die Arginase-Aktivität als ein limitierender Faktor bei der Proliferation von Endothelzellen ermittelt (Li et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies ebenso für die Proliferation von Keratinozyten gilt, denn die CAT-medierte L-Arginin Aufnahme bewirkt mittels zweier unterschiedlicher Mechanismen eine effektive Modulation der Proliferation von Keratinozyten. Einerseits kann durch Substratrestriction die iNOS Aktivität limitiert werden und damit der antiproliferative Effekt hoher NO-Konzentrationen begrenzt werden. Andererseits konnte in residenten Keratinozyten, in denen die iNOS nicht exprimiert ist, ein NO-unabhängiger Effekt auf das Proliferationsverhalten gezeigt werden. Die Inhibition des L-Arginin Transport führt hier zu einer signifikant erniedrigten Proliferation und einem Wachstumsstopp (Abb. 21), der aber nicht in eine Apoptose mündet. Diese Effekte könnten ihre Ursache in einer verminderten Synthese von Polyaminen finden, die eine essentielle Rolle in der Regulation der Zellproliferation spielen. Kürzlich wurde ein Modell vorgestellt, in dem ein direkter inhibitorischer Effekt von NO auf die Ornithin-Decarboxylase diskutiert wird (Ignarro et al. 2001), so dass diese beiden unabhängig erscheinenden Signalwege möglicherweise über den direkten Einfluss von NO miteinander verbunden sind. Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass die CAT-Expression und Aktivität in der humanen Haut ein wichtiger Modulator sowohl der iNOS- als auch Arginase-Aktivität mittels Regulation der Verfügbarkeit des

gemeinsamen Substrats L-Arginin ist. Da auch eine Beteiligung des CAT-medierten Transports von L-Arginin für die Keratinozyten-Proliferation gezeigt werden konnte, sollte die Bedeutung des L-Arginin Transport für die iNOS Expression und Regulation der Aktivität auch in der Psoriasis untersucht werden. Durch Analysen der CAT-Expression in psoriatischer Haut sollte geklärt werden, ob möglicherweise die fehlende bzw. eine verringerte Expression von CAT-Transportern eine limitierte intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin verursacht, welches eine verminderte iNOS-Aktivität zur Folge haben könnte. Doch die Expressionsanalysen in psoriatischen Hautbiopsien zeigen, dass die für den L-Arginin Influx verantwortlichen Transporter CAT-1 und CAT-2 in psoriatischen Plaques beide konstitutiv exprimiert sind (Abb. 22). Da das Expressionsniveau von CAT-2 im Vergleich zur Expression in gesunder Haut unverändert und das der CAT-1 sogar leicht erhöht ist, erscheint die Transportkapazität für L-Arginin auch in psoriatischen Hautläsionen gewährleistet zu sein.

4.4. Arginase-1 Überexpression in psoriatischen Hautläsionen als limitierender Faktor einer verringerten NO-Synthese

Die Arginase-1 oder „Leber-Typ“-Arginase wird konstitutiv nur in Hepatozyten und Endothelzellen exprimiert, ist jedoch durch Th₂-Zytokine, wie z.B. IL-4 oder IL-10 in murinen Makrophagen induzierbar (Munder et al. 1999). Die gefundene Expression in residenten humanen Keratinozyten war überraschend. Da kürzlich eine basale Arginase-1 Expression auch in glatten Muskelzellen (SVCM) gezeigt wurde (Wei et al. 2001), ist somit das Postulat einer exklusiven hepatischen Expression nicht mehr gültig. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass eine Aktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen zur Ko-Expression von iNOS und Arginase-1 in Keratinozyten führt (Abb. 12), wobei die Genexpression beider Proteine invers reguliert wird. Während Zytokine des Th₁-Typs eine iNOS Induktion und eine Hemmung der Arginase-1 bewirken, ist der Effekt durch Th₂-Zytokine umgekehrt (Daten nicht gezeigt). Während die Zytokin-vermittelte Hemmung der Arginase-1 auf mRNA-Ebene bereits nach 24 Stunden (45% des Niveaus in residenten Zellen, siehe Abb. 12A) deutlich ist,

zeigen sich die Auswirkungen auf Protein- und Aktivitätsebene erst nach 96 Stunden (Abb. 13), was durch die lange Halbwertszeit des Proteins (Schimke 1979) zu erklären ist. Die Untersuchungen der Interaktion beider Enzyme zeigt, dass die Inhibition der Arginase-Aktivität eine signifikant erhöhte iNOS Aktivität in Keratinozyten zur Folge hat, nicht jedoch umgekehrt (Abb. 14). Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass unter *in vitro* Bedingungen die Ko-Expression der Arginase-1 die NO Produktion moduliert und limitiert. Aufgrund der ermittelten K_m -Werte für L-Arginin, welche bei 2-20 μM für die iNOS und bei ca. 1-10 mM für die Arginase-1 liegen, war diese Interaktion nicht unbedingt erwartet worden, da für die iNOS eine Substratsättigung unter den Bedingungen der Zellkultur (1 mM L-Arginin im Kulturmedium) angenommen werden muss. Tatsächlich wurde in einer Reihe von Zelltypen gezeigt, dass durch eine erhöhte extrazelluläre L-Arginin Konzentration die Aktivität der iNOS noch gesteigert werden kann, ein Phänomen, welches heute als „Arginin-Paradoxon“ bezeichnet wird (McDonald et al. 1997). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die K_m -Werte durch biochemische Assays mit aufgereinigten Proteinen und Zelllysaten ermittelt wurden und dabei Parameter wie Kompartimentierung und Substrat-Transport nicht berücksichtigt werden, die in der intakten Zelle hingegen zu veränderten lokalen Konzentrationen und K_m -Werten in der Zelle führen könnten. Insbesondere die CAT-Expression scheint eine Schlüsselrolle für die intrazelluläre Verfügbarkeit des L-Arginin in *in vivo* Situation zu spielen, da gezeigt werden konnte dass die eNOS und CAT-1 in den Plasmamembranen der endothelialen Caveoli ko-lokalisiert sind und so das aufgenommene L-Arginin nicht in den cytoplasmatischen Pool gelangt, sondern bevorzugt der eNOS zur Verfügung steht (McDonald et al. 1997). Für den Citrullin – NO Zyklus wird ein ähnliches Modell diskutiert, welches die bevorzugte Versorgung der iNOS postuliert. In der biochemischen Charakterisierung von Enzymen ist neben den K_m -Werten auch die Geschwindigkeit der Substratumsetzung V_{max} eine wichtige Kenngröße. Der Vergleich der V_{max} -Werte der Arginasen (1-20 nmol/min/mg) und der iNOS (1-2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) zeigen eine um den Faktor 10^4 - 10^5 höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Arginasen im Vergleich zur iNOS und führt somit vor allem bei geringen Substratkonzentrationen zu einer Hemmung der iNOS-Aktivität. Im Laufe der Arbeit scheiterten alle Versuche, die Arginase-

1 mit Th₂-Zytokinen in HaCat Zellen zu induzieren bzw. eine verstärkte Expression in primären Keratinozyten zu erreichen. Daher wurden die Untersuchungen der iNOS Aktivität in Abhängigkeit von der L-Arginin Konzentration in Gegenwart der mittels Transfektionen ko-exprimierten Arginase-1 durchgeführt. Die humane Arginase-1 wurde aus der Leberzelllinie HepG2 kloniert und in HaCat und DLD-Zellen überexprimiert. Durch die Verwendung eines RPMI 1640 Mediums ohne L-Arginin und Nitrat konnten Versuche mit genau definierten L-Arginin Konzentrationen durchgeführt werden. Das fehlende Nitrat ermöglichte die Verwendung einer sensitiveren Methode zur Bestimmung der NO-Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat. Die Auswertungen dieser Experimente (Abb. 15 A) zeigte, dass sowohl in DLD-Zellen als auch in HaCat Zellen die Überexpression der Arginase-1 bei den physiologischen Konzentrationen von 20 µM bzw. 50 µM L-Arginin eine deutliche Hemmung der NO-Synthese (63% in DLD- bzw. 54% in HaCat Zellen) zur Folge hat. Dieser Effekt nimmt mit steigenden L-Arginin Konzentrationen ab. Während bei einer Konzentration von 200 µM L-Arginin immer noch eine Hemmung um ca. 20% gefunden wird zeigt sich bei der supraphysiologischen Konzentration von 1 mM kein Effekt mehr. Die durchgeführten Untersuchungen belegen die funktionelle Bedeutung der Arginase-1 Ko-Expression für die Regulation der iNOS-Aktivität bei physiologischen L-Arginin Konzentration von 20-200 µM. Besonders unter Berücksichtigung des Befundes, dass die iNOS-Expression in Keratinozyten nicht über einen negativen Feedback-Mechanismus (Abb. 10 und 11) kontrolliert wird, wie er für eine Reihe anderer Zellen beschrieben wurde (Weisz et al. 1996), stellt die Arginase-1 Expression einen wichtigen Modulator der iNOS-Aktivität dar.

Die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse belegen die Wichtigkeit von L-Arginin Verfügbarkeit und Konzentration sowie die regulatorischen Eigenschaften der Arginase-1 Ko-Expression für die iNOS Aktivität mit Konsequenzen für die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten. So konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass neben exogenem NO auch endogen synthetisiertes NO die Proliferation von Haut-Keratinozyten moduliert und NO nicht nur zu einer signifikanten Verlangsamung des Zellwachstums (Abb. 25), sondern auch zur Hemmung der Genexpression des Proliferationsmarkers Ki-67 in der Haut (Abb. 26) führt.

Nun sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Arginase-1 auch in psoriatischen Hautläsionen exprimiert wird. Die vorliegenden Daten zeigen erstmalig die Überexpression von Arginase-1 mRNA und Protein und damit die Ko-Expression von Arginase-1 und iNOS in psoriatischen Läsionen (Abb. 23). Bemerkenswerterweise handelt es um zwei Proteine, welche außer in Leber und glatten Muskelzellen unter physiologischen Bedingungen nur nach Induktion mit Zytokinen des Th₁-Typs (iNOS) bzw. des Th₂-Typs (Arginase-1) exprimiert werden. Durch immunhistochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass beide L-Arginin metabolisierenden Enzyme im Zytosol lokalisiert sind und damit eine Konkurrenz-Situation um das gemeinsame Substrat entstehen kann. Somit stehen Keratinozyten zwei unterschiedliche Stoffwechselwege zur Metabolisierung von L-Arginin zur Verfügung, und die Ko-Expression von iNOS und Arginase-1 könnte zu einer limitierten iNOS-Aktivität *in vivo* führen. Damit nimmt die Metabolisierung von L-Arginin eine zentrale Rolle in der Fehlsteuerung von Proliferation und Differenzierung psoriatischer Keratinozyten ein. Gleichzeitig bedingt die Arginase-Aktivität eine erhöhte intrazelluläre L-Ornithin Konzentration, welches das Ausgangssubstrat für die Polyaminsynthese darstellt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Polyamine limitierend für die Proliferation von Endothelzellen sind (Li et al. 2002), so dass neben der verminderten iNOS Aktivität auch die Bereitstellung von Bausteinen für die extrazelluläre Matrix die Proliferation der Keratinozyten begünstigt wird. Da die Arginase-1 Expression und Aktivität in Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine in vielen Zellen und Geweben gehemmt wird, erscheint die Überexpression des Enzyms funktionell mit der pathologischen Situation der Psoriasis zu korrelieren und könnte einen molekularen Mechanismus der epidermalen Hyperproliferation darstellen.

4.5. RON-Überexpression als molekularer Mechanismus der Arginase-1 Überexpression in der Psoriasis

Die gefundene Überexpression der Arginase-1 in psoriatischen Keratinozyten wirft die Frage nach dem molekularen Mechanismus dieser Überexpression auf. Aufgrund einer ganz neu erschienenen Publikation wurde dazu die Expression von MSP und RON sowie der PI₃-Kinase Signalweg auf eine mögliche Beteiligung am L-Arginin Metabolismus in humaner Haut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Makrophagen die MSP-vermittelte Aktivierung des RON Rezeptors durch die Modulation der iNOS- und Arginase-Expression eine wichtige Rolle in der Regulation beider Enzyme einnimmt (Morrison and Correll 2002). Untersuchungen an gesunder und an psoriatischer Haut sollten Erkenntnisse zu einer möglichen Beteiligung an den physiologischen und pathophysiologischen Prozessen erbringen. Es konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten den RON Rezeptor exprimieren (Abb. 27). Untersuchungen mit rekombinantem MSP sollten zeigen, ob die MSP-vermittelte Rezeptoraktivierung eine Bedeutung für die Regulation des L-Arginin Metabolismus in der Haut hat. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass exogen zugegebenes bioaktives MSP in Keratinozyten einen hemmenden Effekt auf die Zytokin-induzierte Synthese der iNOS mRNA (Abb. 28A), des iNOS-Proteins (Abb. 28B) sowie auf die Enzymaktivität (Abb. 29) ausübt. Das Ausmaß der MSP-vermittelten Hemmung war abhängig von der Stärke des proinflammatorischen Reizes, also von der Konzentration der Zytokine. Während bei Konzentrationen bis 500 Units des verwendeten Zytokinmixes eine deutliche Hemmung der mRNA-, Protein-Expression und Aktivität gefunden wurde (Abb. 30), bewirkte MSP bei hohen Zytokin Konzentrationen über 500 Units keine hemmenden Effekte mehr auf die iNOS-Expression (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Analyse wurden Untersuchungen der MSP-vermittelten Effekte auf die iNOS-Promotoraktivität in einer Modellzelle, die mit einem 16 kb-Konstrukt der 5'-Region des humanen iNOS-Gens stabil transfiziert worden ist, durchgeführt. Die verwendete Zelle ist ebenfalls humanen und epithelialen Ursprungs und daher gut als Modell geeignet. Hier konnte gezeigt werden, dass MSP die Promotoraktivität in Gegenwart von 100 Units des verwendeten Zytokinmix um 48 % inhibiert. Bei der Verwendung

höherer Zytokin Konzentrationen von 500 bzw. 1000 Units nimmt die inhibitorische Wirkung von MSP auf 29 % bzw. 19 % ab. Dies lässt den Schluß zu, dass die MSP-vermittelte Hemmung der iNOS auf transkriptioneller Ebene erfolgt und abhängig von der Stärke des proinflammatorischen Stimulus ist. Diese Daten stehen im Einklang mit Ergebnissen die zeigen, dass MSP in murinen Makrophagen keinen Effekt auf die Nitritproduktion im akuten Entzündungsgeschehen einen Tag nach der Aktivierung mit LPS hat, wohl aber am dritten Tag in der abklingenden Phase der Entzündung (Chen et al. 1998). Die MSP-modulierte Regulation der iNOS-Expression und Aktivität, welche durch eine verminderte NF- κ B Aktivität zu erklären ist (Liu et al. 1999), scheint sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in abklingenden Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle einzunehmen. In epithelialen Zellen konnte gezeigt werden, dass MSP die Tyrosin-Phosphorylierung der p85-Untereinheit der PI₃-Kinase induziert und eine Assoziation von RON mit der PI₃-Kinase auslöst (Wang et al. 1996). Alle MSP-vermittelten Effekte waren durch Wortmannin, einem spezifischen PI₃-Kinase Inhibitor, vollständig reversibel so dass, die Bindung von MSP an den RON-Rezeptor wie erwartet auch in Keratinozyten diesen Signaltransduktionsweg auslöst. Insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die MSP-vermittelten Effekte die iNOS-Expression und CAT-2 Expression (Abb. 31) inhibieren und gleichzeitig die Arginase-Aktivität steigern (Abb. 32), was insgesamt dem Phänotyp der Psoriasis entspricht, wird die wichtige Funktion von MSP/RON in der Regulation des L-Arginin Metabolismus in der Haut offensichtlich. Daher erscheint die Überlegung sinnvoll, die MSP/RON Expression in psoriatischen Geweben und eine eventuelle Beteiligung an der iNOS und Arginase-1 Regulation in der Pathogenese der Psoriasis zu untersuchen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das von den Keratinozyten endogen produzierte MSP sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in psoriatischen Geweben, im Vergleich zu gesunder Haut signifikant erniedrigt ist (Abb. 33). Da in keiner der durchgeführten *in vitro* Untersuchungen ein Effekt des endogen produzierten MSP gefunden wurde, muss angenommen werden, dass möglicherweise keine Konvertierung des gebildeten pro-MSP in seine biologisch aktive Form erfolgen kann, da die Spaltung an der Zelloberfläche durch Exoproteasen erfolgt und eine intrazelluläre Aktivierung bisher nicht

beschrieben ist. Weiterhin gibt bisher keine Evidenzen für eine intrazelluläre Signalwirkung des MSP ohne Rezeptorbindung. Keratinozyten stellen somit neben Hepathozyten eine zweite Quelle der MSP-Produktion dar, über die Bedeutung kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber nur spekuliert werden. Ein ganz anderes Bild mit möglicherweise weitreichenden Konsequenzen für die Pathogenese der Psoriasis ergab die Expressionsanalyse des RON Rezeptors. Es wurde eine massive Überexpression des Rezeptors sowohl in läsionalen aber interessanterweise auch in nicht-läsionalen Psoriasisgewebe im Vergleich zu gesunder Haut gefunden (Abb. 34). Die immunhistochemischen Analysen von Hautschnitten zeigen, dass das RON Protein in der proliferationskompetenten zapfenförmigen Epidermis-Schicht von Psoriasis Patienten sehr stark exprimiert ist, während in der gesunden Haut lediglich die proliferierende Basalschicht der Keratinozyten eine Expression aufweist. Dieser immunhistochemische Befund wurde auch durch RT-PCR Analysen auf mRNA Ebene unterlegt, wo ebenfalls eine starke Zunahme der Expression in den psoriatischen Hautläsionen gefunden wurde. Die erhöhte Rezeptordichte an der Zelloberfläche und die Möglichkeit einer potentiell erhöhten MSP-Bindung aus dem Blutplasma könnten die starke Induktion der Arginase-1 in psoriatischen Läsionen trotz der entzündlichen Umgebung erklären und den molekularen Mechanismus der Überexpression darstellen. Während in kultivierten Keratinozyten bereits eine sehr starke Expression der Arginase-1 gefunden wurde und durch MSP nur eine moderate Aktivitätserhöhung erreicht werden konnte, könnte die erhöhte RON-Expression in psoriatischen Keratinozyten, die in Kombination mit stark erhöhten MSP-Konzentrationen im Serum von Psoriasis-Patienten auftritt (Abb. 35), einen effektiven Induktionsmechanismus der Arginase-1 darstellen. Aufgrund der hohen, lokalen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in der psoriatischen Haut ist eine effektive Inhibition der iNOS durch MSP unwahrscheinlich, so dass dieser Befund auch eine schlüssige Erklärung dafür bietet, warum iNOS und Arginase-1 in einem proinflammatorischem Milieu ko-exprimiert sind, obwohl normalerweise die Expression von iNOS und Arginase-1 in Entzündungen zeitversetzt verläuft. Während die iNOS in frühen Phasen der Entzündung induziert wird, kommt es bei abklingenden Reaktionen zu einem veränderten Th₁ – Th₂ Verhältnis, die

eine Induktion der Arginase-1 bei gleichzeitiger Inhibition der iNOS zur Folge hat (Modolell et al. 1995).

Da das zirkulierende MSP primär von der Leber synthetisiert wird, werfen die Daten die Frage nach einer möglichen systemischen Beteiligung von pathogenetischen Prozessen an der Psoriasis auf. Keratinozyten weisen ein zu Hepatozyten ähnliches Expressionsprofil der am L-Arginin-Metabolismus beteiligten Proteine auf. Interessanterweise konnte durch eine andere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die RON-Expression NO-abhängig ist. Während sowohl NO-Donoren als auch eine LPS-induzierte iNOS-Aktivität zu einer Hemmung der RON-Expression führen, kann dieser Effekt durch die L-NMA vermittelte Inhibition der iNOS aufgehoben werden. Auch vor dem Hintergrund dieses Ergebnisses ist eine effektive NO-Synthese in psoriatischer Haut, die ja von einer Überexpression des RON-Rezeptors gekennzeichnet ist, unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls berücksichtigt werden, dass MSP in RON-überexprimierenden RawRON8-Zellen eine starke Hemmung der LPS-induzierten iNOS-Aktivität bewirkt (Chen et al. 1998). Da die dort gefundene Hemmung der iNOS-Aktivität allerdings von einer starken Inhibition der iNOS-Protein Expression begleitet wird, stellt sich für zukünftige Untersuchungen die Frage, ob in der Psoriasis möglicherweise eine gestörte Signaltransduktion der MSP/RON vermittelten Effekte vorliegt. Insbesondere die Frage nach Modifikationen der Regulation der PI₃-Kinase Aktivität, die nicht nur das Zellwachstum (Varticovski et al. 1994) reguliert, sondern auch als Modulator der iNOS Aktivität beschrieben wurde (Park et al. 1997), erscheinen für die Pathogenese der Psoriasis von höchstem Interesse. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob die erhöhten MSP-Spiegel im Serum spezifisch für Psoriasis sind oder ob es sich um ein allgemeines Phänomen im Rahmen entzündlicher Prozesse handelt. Hierbei muss auch berücksichtigt werden, dass die Seren von bereits in Therapie befindlichen Patienten stammen, die also unter Medikament-Einfluss stehen. Insbesondere im Falle von Cortikosteroid-Behandlung könnte direkt oder indirekt die Genexpression beeinflusst werden. Abbildung 42 fasst die gefundenen Ergebnisse und das daraus abgeleitete Modell einer limitierten iNOS-Aktivität durch die Ko-Expression und Überexpression der Arginase-1 in psoriatischer Haut schematisch zusammen.

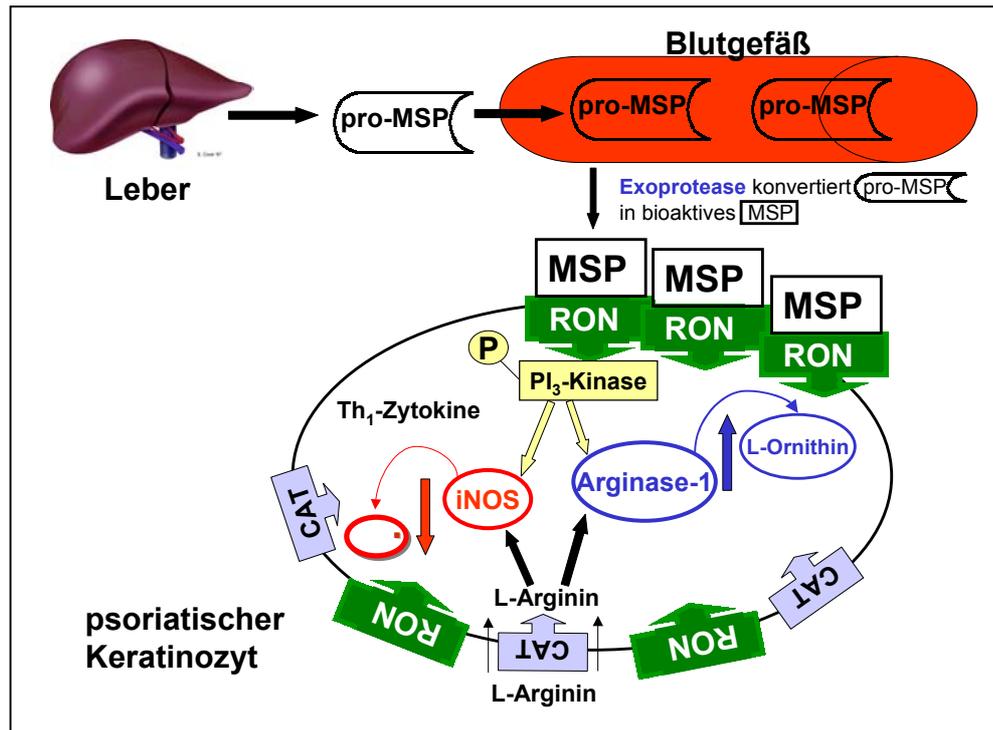


Abb. 42: RON-Überexpression als molekularer Mechanismus der Arginase-1 Überexpression in psoriatischen Keratinozyten. Das von der Leber synthetisierte pro-MSP wird über die Blutbahn transportiert und an der Zelloberfläche der Keratinozyten durch eine Exonuklease in biologisch aktives MSP konvertiert. Durch die MSP-Bindung an den RON-Rezeptor erfolgt über eine Signalkaskade die Aktivierung der PI₃-Kinase. Durch die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine werden iNOS und Arginase-1 in psoriatischen Keratinozyten ko-exprimiert, jedoch erfolgt keine Hemmung der Arginase-1 Expression durch die Th₁-Zytokine wie unter physiologischen Bedingungen, sondern es kommt zu einem PI₃-Kinase-vermittelten Anstieg der Arginase-1 Expression sowie Aktivität und in Folge dessen möglicherweise zu einer limitierten iNOS-Aktivität, die für eine hinreichend hohe NO-Konzentration zur Vermittlung anti-proliferativer Effekte in psoriatischen Läsionen nicht ausreichend ist.

4.6. Bedeutung der Effekte therapeutischer UV-A Dosen für den L-Arginin Metabolismus in der Haut

Um die Bedeutung von UV-A Strahlung als therapeutisches Prinzip für die Psoriasis auf den L-Arginin Metabolismus zu untersuchen, wurden Hautzellen und *ex vivo* Kurzzeit-Organokulturen mit sub-toxischen Dosen von UV-A Licht bestrahlt. Da in dermalen Endothelzellen eine UV-A induzierte iNOS-Expression in Abwesenheit von Zytokinen sowohl *in vitro* in kultivierten dermalen Endothelzellen (HUDEC) als auch *ex vivo* im Endothel humaner Haut-Organokulturen gezeigt werden konnte (Suschek et al. 2001), sollten ergänzende Untersuchungen an Keratinozyten zum Verständnis der Prozesse in der Haut beitragen. Die Versuchsergebnisse in kultivierten humanen Keratinozyten zeigten ein völlig anderes Ergebnis als dies durch die bekannten Ergebnisse in Endothelzellen erwartet worden war. Die UV-A Bestrahlung bewirkte nicht nur keine Induktion der iNOS (Abb. 38 A), sondern zeigte im Gegenteil sogar eine Hemmung der Zytokin-induzierten Expression, welche eine signifikant reduzierte iNOS-Aktivität zur Folge hatte (Abb. 39 A). Im Bezug auf die Expression und Aktivität der Arginase-1 wurden nur sehr moderate Effekte gefunden. Es konnte zwar eine schwache UV-A induzierte Hemmung der Arginase-1 mRNA-Expression in Keratinozyten gezeigt werden (Abb. 38 B), doch zeigen sich keine signifikanten Effekte auf die Arginase-1 Aktivität (Abb. 39 B und 39 C), so dass die Relevanz der UV-A Bestrahlung für die Regulation der Genexpression der Arginase-1 als gering eingestuft werden kann. Die weitere Charakterisierung der Effekte von UV-A auf die iNOS-Regulation führt zu divergenten Effekten. Die Untersuchungen der Effekte von UV-A Strahlung auf die iNOS-Promotoraktivität (Abb. 40) zeigt, dass in Anwesenheit eines oder zweier proinflammatorischer Zytokine die UV-A Strahlung eine Steigerung der Zytokin-induzierten Aktivitätserhöhung des Promotors bewirkt und als zusätzliches Signal fungiert. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus früheren Arbeiten (Busse and Mulsch 1990; Geller et al. 1993) die zeigen, dass für eine maximale iNOS-Aktivität drei verschiedene Signalwege beitragen müssen, daher kann auch bei Verwendung des Zytokinmixes aus drei Zytokinen keine weitere Aktivitätserhöhung durch UV-A gefunden werden. Im Gegensatz dazu führte die UV-A Bestrahlung alleine in Abwesenheit von

Zytokinen zu keiner Induktion der iNOS-Promotoraktivität. Zur weiteren Charakterisierung der Bedeutung von UV-A Strahlung für den L-Arginin Metabolismus in humaner Haut, wurden *ex vivo* Kurzzeit-Organokulturen mit sub-toxischen Dosen von UV-A Licht bestrahlt. Die Analyse der mRNA-Expressionsmuster zeigt eine UV-A induzierte *de novo* Expression von iNOS mRNA in Abwesenheit von Zytokinen, die allerdings nur ungefähr die Hälfte (54 %) der Zytokin-induzierten Expression ohne UV-A Bestrahlung erreicht (Abb. 41). Während die iNOS-mRNA Expression in der Reihenfolge UV-A < Zytokine < UV-A + Zytokine ansteigt, nimmt die Expression der Arginase-1 mRNA in der gleichen Reihenfolge ab, so dass UV-A einen Effekt vermittelt der vergleichbar ist mit dem von proinflammatorischen Zytokinen, nämlich eine inverse Genexpressions-Regulation von iNOS und Arginase-1. Auch die Expression der beiden Transporter CAT-1 und CAT-2 war sowohl nach Zytokin-Behandlung als auch durch UV-A Strahlung erhöht. Interessanterweise konnte damit in der Haut für den CAT-1 Transporter auch mit UV-A Bestrahlung eine Beteiligung der transkriptionellen Kontrolle an der Genexpression dieses Proteins gezeigt werden. Da UV-A Licht bis tief in die Dermis der Haut eindringen (Abb. 43) und dort biologische Effekte auslösen kann (Grether-Beck et al. 1997; Loffler et al. 2002) wird angenommen, dass die Expression der iNOS in den Organokulturen der Haut (Abb. 41 A) vermutlich in dermalen Endothelzellen lokalisiert ist und nicht in den in größerer Zahl vorkommenden Keratinozyten. Es konnte festgestellt werden, dass UV-A Strahlung in Abhängigkeit vom Zelltyp der Haut verschiedene Effekte auf den L-Arginin Metabolismus der Haut ausüben kann.

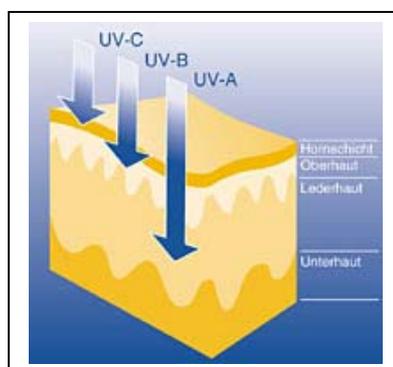


Abb. 43: UV-A Strahlung kann wesentlich tiefer in die Haut eindringen und biologische Effekte auslösen als die kurzwelligere UV-B und UV-C Strahlung.

Die Beteiligung einer UV-A induzierten NO-Synthese an der Regulation von Proliferation und Differenzierung in der Haut erscheint unter physiologischen Bedingungen bei nicht toxischen Dosen UV-A wahrscheinlich, da in der Haut aktives iNOS-Protein exprimiert wird. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen einmal mehr, dass Ergebnisse aus Zellkulturmodellen nicht ungeprüft auf die *in vivo* Situation übertragbar sind. Immunhistochemische Analysen hatten bereits gezeigt werden, dass gesunde Probanden nach UV-A Bestrahlung iNOS-Protein in der Haut und dort vor allem in Endothelzellen und Keratinozyten exprimieren (Kuhn et al. 1998). Dieses Ergebnis konnte bei den hier durchgeführten *ex vivo* Untersuchungen auch gefunden werden, aber nicht in *in vitro* Experimenten an kultivierten Keratinozyten bestätigt werden. Offenbar kommt es im intakten Gewebe im Gegensatz zu *ex vivo* Modellen zu einer Interaktion von verschiedenen Zelltypen im Rahmen des Netzwerks aus Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen. Von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der UV-A vermittelten Effekte für die Regulation der Genexpression der iNOS wird die Identifizierung der beteiligten Transkriptionsfaktoren der UV-A induzierten Expression sein, aber auch Analysen der Zytokinexpressionsprofile der verschiedenen Hautzelltypen nach UV-A Bestrahlung.

5. Literaturverzeichnis

- Ahmed B, Van Den Oord JJ (1999) Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions of the skin. *Br. J. Dermatol.* 141:12-9
- Albina JE, Mills CD, Henry WL, Jr., Caldwell MD (1990) Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J. Immunol.* 144:3877-80
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593-615
- Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M (1999) Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J. Biol. Chem.* 274:30424-32
- Becker K, Savvides SN, Keese M, Schirmer RH, Karplus PA (1998) Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO- carriers. *Nat Struct Biol* 5:267-71
- Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Grapenthin O, Weber H, Wahn V, Kröncke K-D (1997) Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett.* 405:37-41
- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, . (1991) Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67:233
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-70
- Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1996) A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J. Exp. Med.* 184:2007-12
- Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1998a) Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch. Dermatol. Res.* 290:643-51
- Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1998b) Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J. Invest Dermatol.* 110:1-7
- Bune AJ, Shergill JK, Cammack R, Cook HT (1995) L-arginine depletion by arginase reduces nitric oxide production in endotoxic shock: an electron paramagnetic resonance study. *FEBS Lett.* 366:127-30
- Busse R, Mulsch A (1990) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 275:87-90
- Butcher EC (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-6

- Chandra P (1972) Photodynamic action: a valuable tool in molecular biology. *Res. Prog. Org. Biol. Med. Chem.* 3 Pt 1:232-58
- Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS (1994) Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 269:6765-72
- Chen YQ, Fisher JH, Wang MH (1998) Activation of the RON receptor tyrosine kinase inhibits inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by murine peritoneal exudate macrophages: phosphatidylinositol-3 kinase is required for RON-mediated inhibition of iNOS expression.
- Closs EI, Graf P (1999) Cationic amino acid transporters (CATs). Targets for the manipulation of NO-synthase activity? *Pharm. Biotechnol.* 12:229-49
- Closs EI, Graf P, Habermeier A, Cunningham JM, Forstermann U (1997) Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36:6462-8
- Closs EI, Mann GE (1999) Identification of carrier systems in plasma membranes of mammalian cells involved in transport of L-arginine. *Methods Enzymol.* 301:78-91
- Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U (2000) Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol. Pharmacol.* 57:68-74
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16
- Coleman JE (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61:897-946
- Colleluori DM, Morris SM, Jr., Ash DE (2001) Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch. Biochem. Biophys.* 389:135-43
- Danilkovitch A, Leonard EJ (1999) Kinases involved in MSP/RON signaling. *J. Leukoc. Biol.* 65:345-8
- de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Jr., Billiar TR, Geller DA (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:1054-9
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC (1996) Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Exp. Physiol* 81:1021-33
- Deliconstantinos G, Villiotu V, Stravides JC (1995) Release by ultraviolet B (u.v.B.) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br. J. Pharmacol.* 114:1257-65
- Denninger JW, Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1411:334-50
- Deves R, Boyd CA (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev.* 78:487-545

- Diette KM, Momtaz K, Stern RS, Arndt KA, Parrish JA (1984) Role of ultraviolet A in phototherapy for psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11:441-7
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-12
- Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB (1988) Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol* 18:1587-92
- Durante W, Liao L, Iftikhar I, Cheng K, Schafer AI (1996) Platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell proliferation by inducing cationic amino acid transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* 271:11838-43
- Eckert RL, Crish JF, Robinson NA (1997) The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev.* 77:397-424
- Efron DT, Barbul A (1999) Arginine and nutrition in renal disease. *J. Ren Nutr.* 9:142-4
- Enoch T, Norbury C (1995) Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem. Sci.* 20:426-30
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes.
- Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR (1993) Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:522-6
- Gotoh T, Araki M, Mori M (1997) Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:487-91
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144:278-83
- Grether-Beck S, Buettner R, Krutmann J (1997) Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms. *Biol. Chem.* 378:1231-6
- Hammermann R, Dreissig MD, Mossner J, Fuhrmann M, Berrino L, Gothert M, Racke K (2000) Nuclear factor-kappaB mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and Up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol. Pharmacol.* 58:1294-302
- Haraguchi Y, Takiguchi M, Amaya Y, Kawamoto S, Matsuda I, Mori M (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:412-5
- Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS (1996) Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 86:719-29

- Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A (1993) EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.* 7:1124-34
- Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, Kubes P (1997) Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *Faseb J* 11:955-64
- Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, del Soldato P (2001) Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:4202-8
- Irie K, Tsukahara F, Fujii E, Uchida Y, Yoshioka T, He WR, Shitashige M, Murota S, Muraki T (1997) Cationic amino acid transporter-2 mRNA induction by tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 339:289-93
- Kawahara K, Gotoh T, Oyadomari S, Kajizono M, Kuniyasu A, Ohsawa K, Imai Y, Kohsaka S, Nakayama H, Mori M (2001) Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90:165-73
- Kepka-Lenhardt D, Mistry SK, Wu G, Morris SM, Jr. (2000) Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 279:R2237-R2242
- Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A (1993) Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* 114:155-9
- Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Förstermann U (1996) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor- kappaB. *Mol. Pharmacol.* 49:15-21
- Kolb-Bachofen V, Bruch-Gerharz D (1999) Langerhans cells, nitric oxide, keratinocytes and psoriasis. *Immunol. Today* 20:289
- Kolb-Bachofen V, Kröncke K-D, Fehsel K, Suschek CV (2000) Role of inducible nitric oxide synthase in autoimmune or other immune-mediated diseases. In: Ignarro LJ (ed) Academic Press, New York, pp 811-21
- Kolb H, Kolb-Bachofen V (1998) Nitric oxide in autoimmune disease: Cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol. Today* 19:556-61
- Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kroncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1998) Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 111:286-91
- Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V (1994) Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:1105-10
- Kroncke KD, Klotz LO, Suschek CV, Sies H (2002) Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger- dependent transcription. Unique role for NO. *J. Biol. Chem.* 277:13294-301

- Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1995) Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem.* 376:327-43
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1:107-20
- Kröncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V (2001) Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 1:1407-20
- Kröncke KD, Funda J, Berschick B, Kolb H, Kolb-Bachofen V (1991) Macrophage cytotoxicity towards isolated rat islet cells: neither lysis nor its protection by nicotinamide are beta-cell specific. *Diabetologia* 34:232-8
- Kuhn A, Fehsel K, Lehmann P, Krutmann J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (1998) Abberant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV-irradiation in Lupus patients. *J. Invest. Dermatol.* 111:149-53
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SFA, Levi R, Novogrodsky A (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21^{ras}. *J. Biol. Chem.* 270:7017-20
- Lee RH, Efron D, Tantry U, Barbul A (2001) Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *J. Surg. Res.* 101:104-8
- Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:442-8
- Li H, Meininger CJ, Kelly KA, Hawker JR, Jr., Morris SM, Jr., Wu G (2002) Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 282:R64-R69
- Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, Salter M, Moncada S (1991) A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 21:2489-94
- Liu QP, Fruit K, Ward J, Correll PH (1999) Negative regulation of macrophage activation in response to IFN-gamma and lipopolysaccharide by the STK/RON receptor tyrosine kinase.
- Loffler H, Aramaki J, Friebe K, Happle R, Effendy I (2002) Changes in skin physiology during bath PUVA therapy. *Br. J. Dermatol.* 147:105-9
- Lortie MJ, Ishizuka S, Schwartz D, Blantz RC (2000) Bioactive products of arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS and iNOS blockade. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 278:C1191-C1199
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90:9730-4
- Marsden PA, Schapert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 307:287-93

- McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS (1997) A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J. Biol. Chem.* 272:31213-6
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25:1101-4
- Moncada S, Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* 21:361-74
- Mori M, Gotoh T (2000) Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:715-9
- Morris SM, Jr. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 22:87-105
- Morris SM, Jr., Kepka-Lenhart D, Chen LC (1998) Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am. J. Physiol* 275:E740-E747
- Morrison AC, Correll PH (2002) Activation of the stem cell-derived tyrosine kinase/RON receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein results in the induction of arginase activity in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 168:853-60
- Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999) Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 163:3771-7
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316:175-80
- Nanney LB, Skeel A, Luan J, Polis S, Richmond A, Wang MH, Leonard EJ (1998) Proteolytic cleavage and activation of pro-macrophage-stimulating protein and upregulation of its receptor in tissue injury. *J. Invest Dermatol.* 111:573-81
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051-64
- Neuner P, Charvat B, Knobler R, Kirnbauer R, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T (1994) Cytokine release by peripheral blood mononuclear cells is affected by 8-methoxypsoralen plus UV-A. *Photochem. Photobiol.* 59:182-8
- Nicholson B, Manner CK, Kleeman J, MacLeod CL (2001) Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J. Biol. Chem.* 276:15881-5
- Nussler AK, Geller DA, Sweetland MA, Di Silvio M, Billiar TR, Madariaga JB, Simmons RL, Lancaster JR, Jr. (1993) Induction of nitric oxide synthesis and its reactions in cultured human and rat hepatocytes stimulated with cytokines plus LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:826-35
- Ohshiro K, Iwama A, Matsuno K, Ezaki T, Sakamoto O, Hamaguchi I, Takasu N, Suda T (1996) Molecular cloning of rat macrophage-stimulating protein and its involvement in the male reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:273-80

- Ormerod AD, Weller R, Copeland P, Benjamin N, Ralston SH, Grabowksi P, Herriot R (1998) Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 290:3-8
- Park YC, Lee CH, Kang HS, Chung HT, Kim HD (1997) Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:692-6
- Parrish JA (1981) Ultraviolet phototherapy of psoriasis. *Pharmacol. Ther.* 15:313-20
- Pearse RN, Feinman R, Ravetch JV (1991) Characterization of the promoter of the human gene encoding the high-affinity IgG receptor: transcriptional induction by gamma-interferon is mediated through common DNA response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88:11305-9
- Pellat C, Henry Y, Drapier JC (1990) IFN-gamma-activated macrophages: detection by electron paramagnetic resonance of complexes between L-arginine-derived nitric oxide and non-heme iron proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:119-25
- Perrella MA, Patterson C, Tan L, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME (1996) Suppression of interleukin-1beta-induced nitric-oxide synthase promoter/enhancer activity by transforming growth factor-beta1 in vascular smooth muscle cells. Evidence for mechanisms other than NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 271:13776-80
- Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai JC, Hsieh CM, Kourembanas S, Lee ME (1994) Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269:14595-600
- Peunova N, Enikolopov G (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375:68-73
- Pulfer SK, Ott D, Smith DJ (1997) Incorporation of nitric oxide-releasing crosslinked polyethyleneimine microspheres into vascular grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* 37:182-9
- Sakuntabhai A, Matthews JN, Farr PM (1994) Improved prediction of the minimal phototoxic dose in PUVA therapy. *Br. J. Dermatol.* 130:604-9
- Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR (2002) Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol. Chem.* 383:671-81
- Schimke RT (1979) Nutrition Classics. *The Journal of Biological chemistry*, 39:3808-17, 1964. The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. Robert T. Schimke. *Nutr. Rev.* 37:291-3
- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD (1997) Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am. J. Physiol* 272:E181-E190
- Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-6
- Stamler JS, Hausladen A (1998) Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol* 5:247-9

- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-902
- Suschek CV, Bruch-Gerharz D, Kleinert H, Forstermann U, Kolb-Bachofen V (2001) Ultraviolet A1 radiation induces nitric oxide synthase-2 expression in human skin endothelial cells in the absence of proinflammatory cytokines. *J. Invest Dermatol.* 117:1200-5
- Suschek CV, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V (1999) Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J. Biol. Chem.* 274:6130-7
- Varticovski L, Harrison-Findik D, Keeler ML, Susa M (1994) Role of PI 3-kinase in mitogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1226:1-11
- Vekony N, Wolf S, Boissel JP, Gnauert K, Closs EI (2001) Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 40:12387-94
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C (1993) Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 178:605-13
- Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352:729-31
- Wang MH, Cox GW, Yoshimura T, Sheffler LA, Skeel A, Leonard EJ (1994) Macrophage-stimulating protein inhibits induction of nitric oxide production by endotoxin- or cytokine-stimulated mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* 269:14027-31
- Wang MH, Montero-Julian FA, Dauny I, Leonard EJ (1996) Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for epithelial cell migration activated by human macrophage stimulating protein. *Oncogene* 13:2167-75
- Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE (1997) Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 108:438-44
- Wei LH, Wu G, Morris SM, Jr., Ignarro LJ (2001) Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:9260-4
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-11
- Weisz A, Cicatiello L, Esumi H (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG- monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 316 (Pt 1):209-15
- Wink DA, Laval J (1994) The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 15:2125-9
- Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovessi I, Steed DL, Billiar TR (1998) Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J. Clin. Invest* 101:967-71

Zamora R, Vodovotz Y, Aulak KS, Kim PK, Kane JM, III, Alarcon L, Stuehr DJ, Billiar TR (2002) A DNA microarray study of nitric oxide-induced genes in mouse hepatocytes: implications for hepatic heme oxygenase-1 expression in ischemia/reperfusion. *Nitric. Oxide.* 7:165-86

6. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit erstmalig beschriebene Überexpression der Arginase-1 in Hautläsionen von Psoriasis-Patienten könnte nicht nur die iNOS-Aktivität *in vivo* limitieren, sondern ist auch ein Beleg für die Beteiligung eines zweiten Proteins des L-Arginin Metabolismus an der Pathogenese der Psoriasis. Weiterhin erklärt dieses überraschende Ergebnis das „iNOS/Psoriasis-Paradoxon“, in welchem die „konstitutive“ iNOS-Expression in psoriatischen Hautläsionen und die damit einhergehenden, potentiell hohen lokalen NO-Konzentrationen keinen anti-proliferativen Effekt zur Folge haben, sondern psoriatische Keratinozyten durch eine Hyperproliferation charakterisiert sind. Die Ko-Expression von iNOS und Arginase-1 führt nicht nur zu einer Konkurrenz-Situation um das gemeinsame Substrat L-Arginin, sondern *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass die Arginase-Aktivität eine regulatorische Funktion auf die iNOS-Aktivität ausübt. Die gefundene Überexpression der Arginase-1 in psoriatischen Hautläsionen könnte die iNOS-Aktivität *in vivo* limitieren und die L-Arginin Metabolisierung eine zentrale Rolle bei der Fehlsteuerung von Proliferation und Differenzierung psoriatischer Keratinozyten einnehmen. Durch die Überexpression des RON-Rezeptors in psoriatischen Hautläsionen und den erhöhten MSP-Konzentrationen im Serum von Psoriasis-Patienten konnte durch die Beteiligung des MSP/RON Signalwegs der molekulare Mechanismus der Arginase-1 Überexpression aufgezeigt werden. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass durch eine MSP/RON-vermittelte Aktivierung der PI₃-Kinase sowohl die iNOS- als auch die Arginase-Aktivität moduliert werden, wodurch weitreichende Konsequenzen für die Pathogenese der Psoriasis entstehen könnten. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob durch die erhöhten MSP-Konzentrationen, die von der Leber als pro-MSP synthetisiert werden, eine systemische Beteiligung an der Pathogenese der Psoriasis denkbar ist und ob möglicherweise Defekte in der Signaltransduktion der MSP/RON vermittelten Aktivierung der PI₃-Kinase in psoriatischen Keratinozyten vorliegen, die zur pathophysiologischen, „konstitutiven“ iNOS-Expression in der Psoriasis führen.

7. Abkürzungen

AP-1	Aktivator Protein-1
ATP	Adenosin-triphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
Bp	Basenpaare
CAT	kationische Aminosäure Transporter
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive NO-Synthase
DAN	2,3-Diaminonaphtalen
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-mmoniumethyl)amino] diazen-1-ium-1,2diolat
DETA/NO _{-NO}	Denitrosylierte Komponente von DETA/NO
EC	Endothelzellen
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
γ -IFN	Gamma-Interferon
IRE	IFN-responsibles Element
I κ B	Inhibitor von κ B
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KC	humane Keratinozyten
LPS	Lipopolysaccharid
MSP	Makrophagen stimulierendes Protein
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat
NIO	L-N-(l-Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen

nNOS	neuronale NO-Synthase
ONOO ⁻	Peroxynitritanion
PARP	poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	gepufferte Salzlösung
PI ₃	Phospho-Inositol-3-Kinase
RNOI	reaktive Stickstoffoxid Intermediate
ROI	reaktive Sauerstoff Intermediate
RON	recepture d'origine nantaise
RPMI	Ross Park Memorial Institute
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNAP	S-Nitrosothiol-N-Acetylpenicillamin
SP-1	Transkriptionsfaktor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
Th ₁	T-Helfer-Lymphozyten Subpopulation
Th ₂	T-Helfer-Lymphozyten Subpopulation
UV-A	Ultraviolette Strahlung A (320-400 nm)
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsions Molekül
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Oliver Schnorr
Adresse: Höhenstr. 56
40227 Düsseldorf
Geburtsdatum: 20. August 1969
Geburtsort: Bocholt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 – 1980 Grundschule in Wesel
1980 - 1989 Andreas-Vesalius-Gymnasium Wesel
Mai 1989 Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1989 – 1990 Grundwehrdienst

Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

10/1990 – 1/1997 Studium der Biologie
an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Abschluss: Diplom (Benotung: 1,5)
1/1997 Diplom mit dem Thema:
„Biochemische Untersuchungen von Cytoplasmamembranen
der Blaualge Synechocystis PCC 6803" (Benotung: 1,3)
2/1997 – 10/1997 Industriepraktikum bei der Körber GmbH in Essen
11/1997 – 10/1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Institut für
Transfusionsmedizin HHU Düsseldorf
11/1998 – 2/2000 Gründung und Aufbau der Schnorr-Technologien GmbH in
Oberhausen

2/2000- 4/2002

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) in der
Immunbiologischen Forschungsgruppe am BMFZ der HHU

Wissenschaftliche Schwerpunkte

Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der
induzierbaren NO-Synthase (iNOS) für die Pathogenese
entzündlicher und hyperproliferativer Hauterkrankungen

Genregulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Mitgliedschaft in Fachgesellschaften

Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)

The Oxygen Society

Publikationsverzeichnis

I. Originalarbeiten

1. Schnorr O, Suschek C, Kolb-Bachofen V. (2003)
The importance of cationic amino acid transporter (CAT) expression in human skin
Journal of Investigative Dermatology, im Druck
2. Schnorr O, Bruch-Gerharz D, Suschek V, Pfeilschifter J, Beck KH, Kolb-Bachofen
(2003)
Arginase-1 overexpression in psoriasis: Limitation of inducible nitric oxide synthase
activity as a molecular mechanism for keratinocyte proliferation
American Journal of Pathology (2003), 162: 203-211
3. Suschek V, Schnorr O, Hemmrich K, Aust O, Klotz O, Sies H, Kolb-Bachofen
(2003)
The critical role of L-arginine in endothelial cell survival during oxidative stress
Circulation, eingereicht

II. Abstracts

1. Schnorr O, Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (2000)
Human keratinocytes express inducible nitric oxide synthase and cationic amino acid
transporter (CAT)-2 after activation by proinflammatory cytokines
Immunobiol 203: 126
2. Schnorr O, Suschek C, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, Bruch-Gerharz D (2002)
Ultraviolet A irradiation favours expression and substrate supply for the inducible
nitric oxide synthase in normal human skin. Arch Derm Res 294: 39

3. Schnorr O, Bruch-Gerharz D, Suschek V, Kolb-Bachofen (2002)
Arginase-1 overexpression in psoriasis: Limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte proliferation. Nitric Oxide 6 (4): 461

III. Vorträge

1. Schnorr O, Suschek C, Bruch-Gerharz D, Kolb-Bachofen V (2001)
Ultraviolett A irradiation favours expression and substrate supply for the inducible nitric oxide synthase in normal human skin
7. NO-Forum der deutschsprachigen Länder
Magdeburg, 4.-6. Oktober 2001
2. Schnorr O, Suschek C, Kolb-Bachofen V (2002)
Macrophage stimulating protein (MSP) suppresses inducible nitric oxide synthase expression in human keratinocytes
8. NO-Forum der deutschsprachigen Länder
Frankfurt, 3.-5. Oktober 2002

IV. Posterpräsentationen

1. Schnorr O, Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V (2000)
Human keratinocytes express inducible nitric oxide synthase and cationic amino acid transporter (CAT)-2 after activation by proinflammatory cytokines
6. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, Mainz, 20.-21.9.2000
2. Schnorr O, Suschek C, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, Bruch-Gerharz D (2001)
Ultraviolett A irradiation favours expression and substrate supply for the inducible nitric oxide synthase in normal human skin
20th Annual Meeting of the American Society of Photobiology, Chicago, USA, 7.-12.7.2001
3. Schnorr O, Suschek C, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, Bruch-Gerharz D (2002)
Ultraviolett A irradiation favours expression and substrate supply for the inducible nitric oxide synthase in normal human skin
XXIX. Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Berlin, 28.2.-2.3.2002
4. Schnorr O, Bruch-Gerharz D, Suschek V, Kolb-Bachofen (2002)
Arginase-1 overexpression in psoriasis: Limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte proliferation
2nd International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Prag, Tschechien, 16.-20.7.2002

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen und mir erlaubten verwendet habe.

Oliver Schnorr

Düsseldorf, den 21. Januar 2003