

Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer

**Expression der Arginase Isoformen in Fibroblasten
während der Wundheilung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von
Martin Alexander Schick
aus Tübingen

2007

Dekan:	Professor	Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozentin	Dr. M. Witte
2. Berichterstatter:	Privatdozent	Dr. B. Balletshofer

meinen Eltern und meiner Frau Judith

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 DIE WUNDHEILUNG AKUTER WUNDEN	3
1.1.1 <i>Die Inflammation und Hämostase</i>	4
1.1.2 <i>Die Proliferation</i>	4
1.1.3 <i>Die Regeneration</i>	5
1.1.4 <i>Die Matrixsynthese</i>	5
1.1.5 <i>Die Fibroblasten</i>	6
1.2 DER ARGININSTOFFWECHSEL	7
1.3 DER CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER (CAT).....	8
1.4 DIE ROLLE VON INTERLEUKIN - 4 (IL- 4) FÜR DIE WUNDHEILUNG	10
1.5 DIE ROLLE VON TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF- β) FÜR DIE WUNDHEILUNG	11
2 FRAGESTELLUNG	13
3 MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 OPERATION DER TIERE	14
3.1.1 <i>Gewinnung von normalen Hautfibroblasten (NFB)</i>	14
3.1.2 <i>Gewinnung der Wundfibroblasten (WFB)</i>	15
3.1.3 <i>Genebeentnahme der Leber und Niere</i>	16
3.2 ZELLKULTUR	16
3.2.1 <i>Standardbedingungen</i>	16
3.2.2 <i>Stimulation der Zellen mit Zytokinen</i>	18
3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHER TEIL	20
3.3.1 <i>Standardbedingungen</i>	20
3.3.2 <i>Gewinnung der RNA</i>	20
3.3.3 <i>DNase Verdau</i>	20
3.3.4 <i>Vermessung der RNA Proben</i>	21
3.3.5 <i>Überprüfung der RNA Qualität</i>	21

3.3.6	<i>Die Reverse Transkription</i>	23
3.3.7	<i>Aufreinigung der cDNA</i>	23
3.3.8	<i>Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	24
3.3.9	<i>GAPDH – PCR</i>	25
3.3.10	<i>Arginase I (Arg I)-PCR</i>	26
3.3.11	<i>Arginase II (Arg II) -PCR</i>	29
3.3.12	<i>iNOS PCR</i>	30
3.3.13	<i>CAT-1 PCR</i>	31
3.4	DATENVERARBEITUNG	32
3.4.1	<i>Scannen der Gele</i>	32
3.4.2	<i>Analyse der Banden</i>	32
3.4.3	<i>Bearbeitung der Zahlenwerte</i>	33
3.5	GENAUE MATERIALBEZEICHNUNG	35
4	ERGEBNISSE	39
4.1	BASALE EXPRESSION DER VERSCHIEDENEN ENZYME BZW. TRANSPORTER	39
4.2	BASALE EXPRESSION VON ARG I, iNOS UND CAT IN WFB DER ERSTEN PASSAGE	40
4.3	ARG I EXPRESSION DER WFB UNTER TGF- β_1 STIMULATION.....	40
4.4	ARG II EXPRESSION DER WFB UNTER TGF- β_1 STIMULATION	41
4.5	iNOS EXPRESSION DER WFB UNTER TGF- β STIMULATION	42
4.6	CAT-I EXPRESSION DER WFB UNTER TGF- β_1 STIMULATION.....	42
4.6.1	<i>Nicht gewertete Versuche der CAT-I Expression von WFB unter TGF-β_1</i>	43
4.7	EINFLUß VON TGF- β_1 AUF DEN ZEITLICHEN VERLAUF DER ARG I, II UND CAT EXPRESSION VON WFB TAG 10	44
4.8	ARG-I EXPRESSION DER WFB UNTER INTERLEUKIN-4 STIMULATION	45
4.9	ARG-II EXPRESSION DER WFB UNTER IL-4 STIMULATION	46
4.10	iNOS EXPRESSION DER WFB UNTER IL-4 STIMULATION	46
4.11	CAT-I EXPRESSION DER WFB UNTER IL-4 STIMULATION	47
4.12	ZEITLICHER VERLAUF DER EXPRESSION VON ARG I, II SOWIE iNOS UND CAT IN WFB UNTER STIMULATION MIT IL-4	48
4.13	EXPRESSION VON ARG I, II UND CAT-I IN NFB UNTER STIMULATION MIT TGF-	

	β_1	48
4.14	EXPRESSION VON ARG I UND II SOWIE CAT-I DER NFB UNTER IL-4 STIMULATION	49
5	DISKUSSION.....	50
5.1	IN VITRO MODELL UND FIBROBLASTEN PHÄNOTYP	50
5.2	BASALE EXPRESSION DER ENZYME ARGINASE I, II , iNOS UND CAT.....	52
5.3	EXPRESSION DER ENZYME UNTER TGF- β STIMULATION	54
5.3.1	<i>Arginase I Expression</i>	54
5.3.2	<i>Arginase II Expression nach Stimulation mit TGF-β_1</i>	55
5.3.3	<i>iNOS Expression</i>	55
5.3.4	<i>CAT-I Expression</i>	55
5.4	EXPRESSION DER ENZYME NACH IL-4 STIMULATION	57
5.4.1	<i>Arginase I</i>	57
5.4.2	<i>Arginase II</i>	58
5.4.3	<i>iNOS Expression</i>	58
5.4.4	<i>CAT-I Expression</i>	60
5.5	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER GEWONNENEN ERGEBNISSE	61
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
7	LITERATURVERZEICHNIS	65
8	DANKSAGUNG.....	73
9	LEBENS LAUF.....	74

Abkürzungsverzeichnis

Arg I	Arginase I
Arg II	Arginase II
bp	Basenpaare
CAT-I	Cationic amino acid transporter I
cDNA	complementary DNA
CM	Complete Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FCS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-phosphatDehydrogenase
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
mM	Millimolar
MOPS	3N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NFB	normaler Hautfibroblast
ng	Nanogramm
NO	Nitric Oxide
PAF	platelet-activating factor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PVA- Schwamm	Polyvinyl- Schwamm
RNA, RNS	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RPM	Umdrehungen/ Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
TGF- β	transforming growth factor- β
TH-Lymphozyten	T-Helfer-Lymphozyt
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amino-methanhydrochlorid
UV	Ultraviolett
WFB	Wundfibroblast
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

Allein in Deutschland leiden ca. 10 Mio. Menschen an chronischen Wunden, die auch heute noch ein großes Problem in der Behandlung im klinischen Alltag darstellen. Die erhebliche Reduzierung der Lebensqualität der Patienten mit Wundheilungsstörungen und die enormen Kosten der langwierigen Behandlungen, wie z.B. das Ulcus cruris bei chronisch venöser Insuffizienz, das Malum perforans des Diabetikers oder die Narbenkontraktionen der Verbrennungsoffer begründen, dass das starke Interesse um die Grundlagenforschung der Wundheilung nicht abreißt. Aber auch akute Wunden, erlitten durch Operationen oder Traumata, können zu erheblichen Problemen in der Behandlung der Patienten führen. Infektionen, fehlender bzw. verlängerter Wundschluss oder Passagestörungen bis hin zum Ileus bei Beteiligung des Intestinaltraktes sind nur einige Beispiele, die zur einer immensen Belastung für den Patienten bis hin zum letalen Ausgang führen können.

1.1 Die Wundheilung akuter Wunden

Der Wundheilungsprozess ist ein in sich dynamischer Vorgang, welcher aber dennoch in drei große, zeitlich ineinander fließend übergehende Abschnitte unterteilt werden kann (Abb.1) : Inflammation und Hämostase , (2) Proliferation und (3) Regeneration.

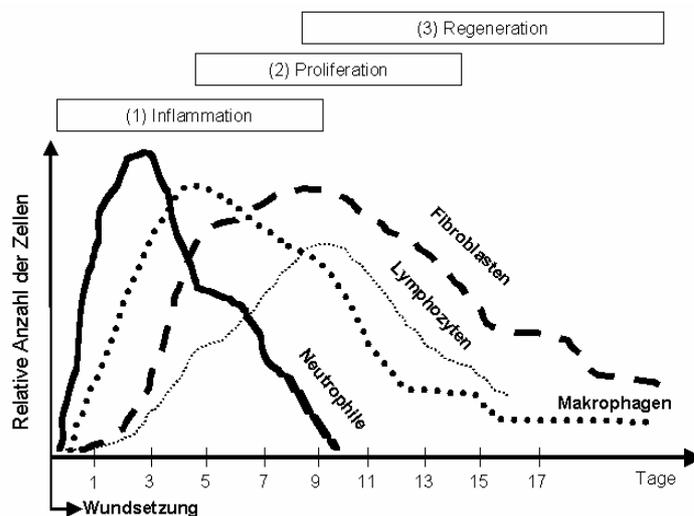


Abb. 1: Ablauf der akuten Wundheilung mit den verschiedenen Phasen (Inflammation, Proliferation, Regeneration) und dem Auftreten der jeweiligen charakteristischen Zellpopulation (119)

1.1.1 Die Inflammation und Hämostase

Dieser Abschnitt ist durch a) eine erhöhte Permeabilität der Gefäße, b) eine erhöhte Chemotaxis für die Zellen der Wundheilung (z.B.: Makrophagen, Lymphozyten und Thrombozyten), c) eine Aktivierung der zur Migration befähigten Zellen (z.B.: Endothelzellen, Fibroblasten) und ist auch durch d) eine lokale als auch systemische Sezernierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie den Interleukinen, Fibronectin, Serotonin, dem platelet-activating factor (PAF), dem platelet-derived growth factor (PDGF) und dem transforming growth factor- β (TGF- β) charakterisiert (119).

Der Defekt der Gefäße im Wundmilieu führt, bedingt durch die Exposition der subendothelialen Matrix, zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, welches eine Blutstillung und Hämostase bewirkt. Die Thrombozyten, die an diesem Schritt maßgeblich beteiligt sind, zählen zur entscheidenden Quellen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in dieser Phase. Die lokale Freisetzung dieser Botenstoffe veranlasst viele verschiedene Zellpopulationen (Makrophagen, Fibroblasten) zur Migration in das Wundmilieu. Spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche, welche den Vorgang der Zellwanderung immens beeinflussen, wie z.B. der Integrinrezeptor der neutrophilen Granulozyten oder die Selektinrezeptoren der Endothelzellen, unterliegen einem Wandel, der eine effizientere Migration erlaubt (2). Die lokal freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren regulieren die unterschiedlichen Zellen im Wundmilieu spezifisch durch ihre Rezeptoren. PDGF zum Beispiel bewirkt eine starke chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten, nicht aber auf Endothelzellen (43).

Die Migration der Zellen in das Wundmilieu bewirkt häufig ihre Aktivierung. Dies geht mit einer gesteigerten Proliferation, Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und zellspezifischen Proteinen wie auch einer vermehrten oder verminderten Expression von Zelloberflächenrezeptoren einher.

1.1.2 Die Proliferation

Diese Phase der Wundheilung ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Zellarten, deren Stimuli aber auch der Inhibition der stimulierten Zellen bis hin zum programmierten Zelltod, der Apoptose. Klinisch entspricht dies der Entstehung des Granulationsgewebes, welches sich durch Gefäß- und Zellreichtum auszeichnet.

Als erste Zellpopulation beginnen die Fibroblasten aus den Wundrändern und die

Endothelzellen aus den noch intakt gebliebenen Venolen in das Wundmilieu einzuwandern und zu proliferieren. Dieser Zustand wird durch Thrombozyten und aktivierte Makrophagen angeregt (119). Auch die Myofibroblasten, die sich durch den Gehalt an glattem Muskel-Aktin (α -smooth-muscle-actin) und Desmin von den normalen Fibroblasten unterscheiden, beginnen sich aus ihrem Ruhezustand zu vermehren (27). Im späteren Verlauf der Wundheilung kontrahieren sich diese Zellen, um die Wundfläche zu verkleinern.

1.1.3 Die Regeneration

Der adäquate Auf-, Um- und Abbau der extrazellulären Matrix steht in diesem Abschnitt im Vordergrund. Die Interaktion von Matrix und Zellen wird durch die transmembranären Integrinrezeptoren beeinflusst. Die Expression dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Fibroblasten unterliegt einem heilungsabhängigen Wandel (20). Über den Regulationsmechanismus dieser Rezeptoren ist noch sehr wenig bekannt, dennoch weiß man heute, dass die Zytokine PDGF, TGF- β und TNF- α die Expression der Integrine beeinflussen und dadurch die Zell-Matrix Kommunikation und Matrixsynthese (119).

Vom klinischen Aspekt betrachtet wird diesem Abschnitt der Wundheilung, der morphologisch mit der Entstehung des Narbengewebes einhergeht, eine bedeutende Rolle eingeräumt. Viele Krankheiten zeichnen sich durch eine Störung in der Matrixsynthese aus. Die verminderte Kollagenbildung bei Diabetikern, die überschießende Synthese beim Keloid oder die hypertrophe Narbenbildung seien hier als Beispiele genannt (39).

1.1.4 Die Matrixsynthese

Die extrazelluläre Matrixsynthese in einem Wundmilieu unterliegt einem zeitabhängigen Verlauf. Fibrin und Fibronectin bilden die ersten Matrixproteine (60). Es folgen Glykosaminoglykane und Proteoglykane, welche notwendig sind, um eine spätere Ablagerung und Verknüpfung der extrazellulären Matrix zu bewirken.

Mit zunehmendem Reifungsprozess der Wunde sinkt der initial hohe Gehalt an Kollagen Typ III auf unter 10% des Gesamtkollagengehalts. Kollagen I, welches für die Zugfestigkeit der Wunde hauptverantwortlich ist, steigt dagegen zunehmend an (s. Abb.2) (6, 71). In der frühen Phase der Wundheilung werden die Kollagenfasern netzartig ausgerichtet. Erst durch die verstärkte Glykosylierung der Lysinreste der Kollagenfasern,

deren Bündelung und parallele Anordnung durch mechanische Zug-, Druck- und Scherkräfte kommt es zu einer Zunahme der Reißfestigkeit der Narbe. Am Ende dieses Prozesses erreicht die Reißfestigkeit der Wunde ca. 80 % des Urzustandes (33). Dennoch erreicht eine Narbe nie die Belastbarkeit gesunder Haut.

Die Produktion des Kollagens wird hauptsächlich von Fibroblasten übernommen. Die Synthese dieses Proteins steigt stetig bis zur fünften Woche nach Induktion einer Wunde an (31, 70). Dies korreliert positiv mit der Zellzahl der Fibroblasten, aber auch die Kollagensynthese pro Zelle wird gesteigert.

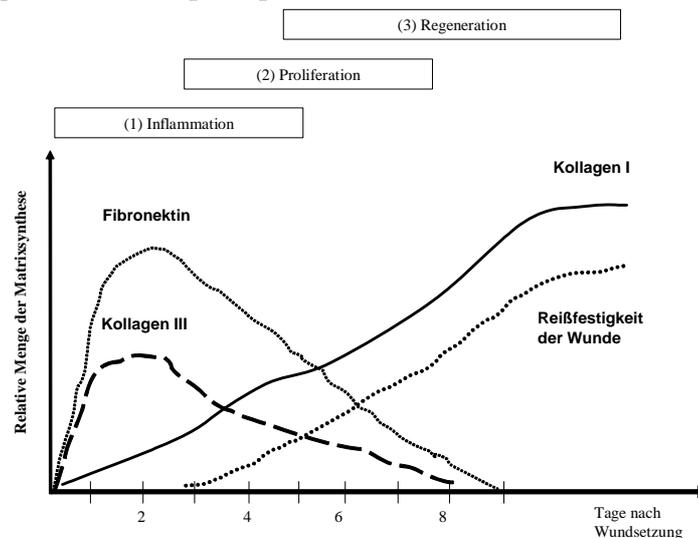


Abb. 2: Extrazelluläre Matrixsynthese [zusammengefasst anhand der Ergebnisse von (20, 22, 33, 38, 119)]

1.1.5 Die Fibroblasten

Lange Zeit galten die Fibroblasten als flache, lange Zellen, die mit einem ovalen Nucleolus ausgestattet sind und die Fähigkeit besitzen, extrazelluläre Matrix zu synthetisieren. Doch Castor et al. zeigte schon 1962, dass es erhebliche Varianten von Fibroblasten aus unterschiedlichen Geweben gibt (18). Inzwischen weiß man, dass Fibroblasten sich sowohl in den Zelloberflächenrezeptoren als auch bezüglich Expression, Speicherung, Produktion und in der Aktivität verschiedener Proteine unterscheiden (14, 29, 72, 100, 117, 121). Ferner konnte gezeigt werden, dass sich Fibroblasten im Laufe der Wundheilung durch Mediatoren phänotypisch verändern (27). Unklarheit herrscht momentan noch darüber, ob die Zellen sich durch einen externen Stimulus - z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren - phänotypisch ändern oder ob gezielt Subpopulationen der Fibroblasten aus der G_0 -Phase des Zellzykluses zur Proliferation und Aktivierung angeregt werden (37).

Arginin ist das einzige Substrat für das Enzym inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), dass Arginin zu Citrullin und NO konvertiert. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass NO für die Wundheilung einen essentiellen Bestandteil darstellt (16, 61, 89, 96, 97, 104, 120, 125). Die Produktion von NO ist in der frühen Phase der Entzündungsreaktion nach Wundsetzung gesteigert (3, 62, 111). Eine Blockierung der NO-Produktion bewirkt eine Verminderung der Kollagenbildung und damit auch eine Herabsetzung der Reißfestigkeit der Wunde (97, 98). Durch die in vivo Transfektion von iNOS cDNA kann wiederum eine vermehrte Kollagenbildung induziert werden (107). Tabelle 1 gibt hierüber einen kurzen Überblick.

Tab. 1: Bedeutung des Nitric Oxide (NO) für die Wundheilung (1, 120)

	<i>Reissfestigkeit der Wunde</i>	<i>Kollagengehalt</i>	<i>Reepithelisation</i>
NO Donoren	↑	↑	
iNOS Transfektion	↑	↑	
iNOS Inhibierung	↓	↓	↓
iNOS Knock out	↔	↔	↓

L-Arginin wird alternativ durch das Enzym Arginase zu Ornithin und Harnstoff metabolisiert. Das Enzym Arginase existiert in zwei Isoformen Arginase I (Arg I) und Arginase II (Arg II). Arginase I ist im Zytosol und Arginase II in den Mitochondrien lokalisiert. Die beiden Enzyme unterscheiden sich nicht nur in der Lokalisation in der Zelle, sondern auch in ihrer Quantität in den verschiedenen Organen. Arginase I wird hauptsächlich in der Leber und in den Erythrozyten und Arginase II in der Niere, Prostata und im Dünndarm exprimiert (40, 52, 82). Einige Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen exprimieren beide Isoformen (112).

Ornithin kann weiter zu Prolin oder Polyaminen (Spermidin, Spermin, Putrescin) verstoffwechselt werden (s. Abb.: 3). Prolin ist ein essentieller Baustein der Kollagensynthese, dagegen sind Polyamine wichtige Stoffe für die Proliferation und für die DNA Synthese einer Zelle (84, 123).

1.3 Der Cationic Amino acid Transporter (CAT)

Früher wurde der Transport basischer Aminosäuren in die Zelle dem y^+ - System zugerechnet (30). Nach der Dekodierung der DNA wurde dieses System in die Familie der „Cationic amino acid transporter“ (CAT) unterteilt (CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-

3), welche die Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin transportieren (23, 56, 67-69). Der Subtyp CAT-1 ist mit Ausnahme der Leber ein nahezu ubiquitär vorkommender Transporter (siehe Tab.: 2) (55, 59).

Tab. 2: CAT Isoformen in verschiedenen Organen der Maus. CAT-1 wurde mittels Northern Analyse und CAT-2A und B wurden mittels RT-PCR ermittelt (30)

Transporter	mCAT-1	mCAT-2A	mCAT-2B
Dickdarm	+++	-	+/-
Dünndarm	++	-	-
Haut	+++	++	+++
Herz	+	+	+/-
Leber	-	++++	-
Makrophagen (inaktiviert)	++	-	-
Makrophagen (aktiviert)	++	-	++
Niere	++	-	-
Skelettmuskel	+/-	++	++
Skelettmuskel (nach Trauma)	+	++++	++

Die Michaeliskonstante (K_m) von Arginin für CAT-1 beträgt ca. 0,07- 0,25 μ M (30). Die Aufnahme von Arginin wird durch kationische Aminosäuren und in sehr hohen Konzentrationen auch durch neutrale Aminosäuren gehemmt (59). Der Transporter besitzt je nach Modellvorstellung 12-14 transmembranäre Strukturen und 2-3 N-Glykosylierungsstellen auf der extrazellulären Seite. (s. Abb. 4).

Nach der Entdeckung von NO als Mediator für viele physiologische Funktionen wurde die Bedeutung des CAT neu definiert, da die NO Synthese durch die intrazelluläre Argininkonzentration reguliert werden kann, für deren Transport CAT verantwortlich ist (77).

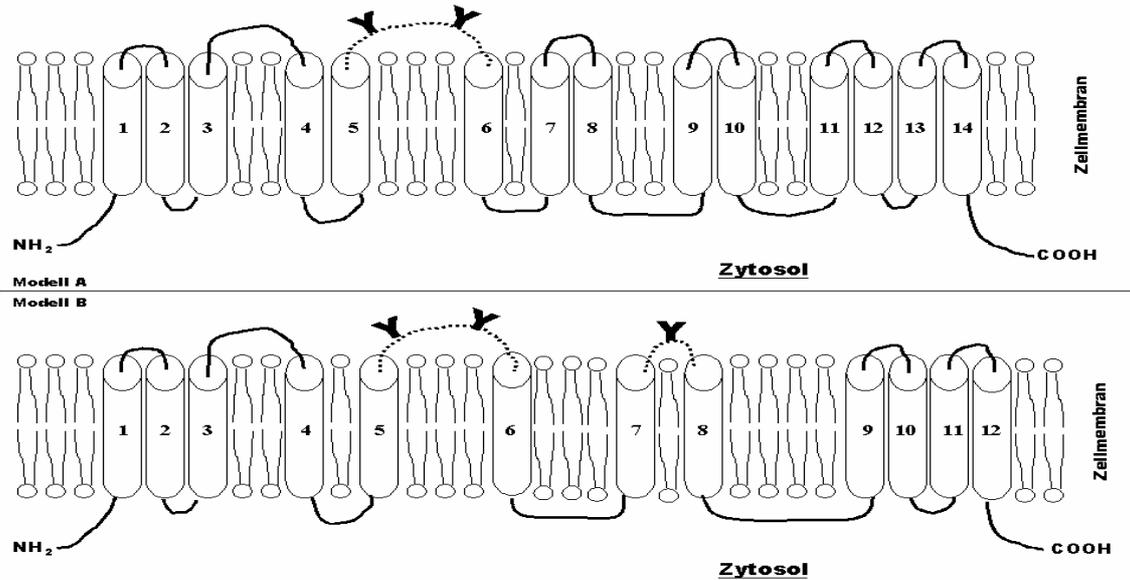


Abb. 4: Zwei Modellvorstellungen des CAT-1 Transporters: Modell A mit 14 transmembranären Domänen und Modell B mit 12 Domänen. Die Y stellen die Glykosylierungsstellen dar (30)

1.4 Die Rolle von Interleukin - 4 (IL- 4) für die Wundheilung

IL-4 wirkt über einen transmembranären Rezeptor, der aus zwei unterschiedlichen Ketten besteht. Die γ -Kette ist identisch zu der des IL-2, IL-7 und möglicherweise des IL-13 Rezeptors (47) . Die spezifische Wirkung des IL-4 Rezeptors entfaltet sich über die α -Kette (91). Mastzellen und TH₂-Lymphozyten sind die stärksten Produzenten dieses Botenstoffes.

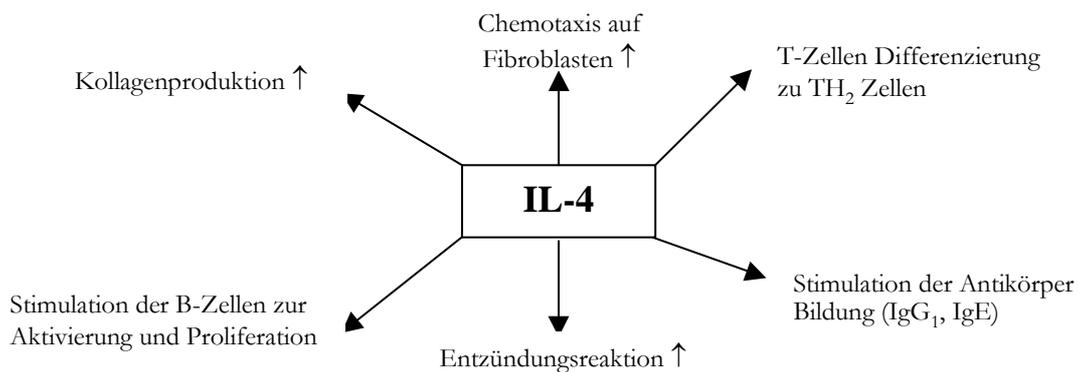


Abb. 5: Schematische Darstellung wichtiger IL-4 Funktionen (21, 91, 93)

IL-4 steigert die Kollagen I und III Synthese und wird in pathologischen Zuständen wie

z.B. der Keloidbildung vermehrt exprimiert (21, 93, 94). Der verzögerte Wundschluss einer bakteriell infizierten Wunde konnte durch die lokale Applikation von IL-4 ausgeglichen werden.

IL-4 hat ebenfalls einen hohen Stellenwert in der Immunabwehr des Körpers. In IL-4 Knock-out Mäusen liegt eine mangelnde Entzündungsreaktion und eine erhebliche Reduzierung der IgG₁ und IgE-Antikörperkonzentration vor (91).

1.5 Die Rolle von Transforming Growth Factor β (TGF- β) für die Wundheilung

TGF- β spielt eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese, Angiogenese und vor allem bei der extrazellulären Matrixsynthese. In den letzten Jahren wurden bislang fünf Subtypen dieses Zytokins analysiert (TGF- β 1-5). Der dazugehörige transmembranäre Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten, die erst durch ihren Zusammenschluss im Plasmalem die vollständige Wirkung der Signalkaskade auslösen können. Experimente lassen vermuten, dass TGF- β über verschiedene Signaltransduktionswege verfügt und somit auf unterschiedliche Weise Einfluss nehmen kann. TGF- β wird in der Phase der Hämostase in geringen Mengen aus den α -Granula der Thrombozyten abgegeben. Nach Stimulierung durch das Wundmilieu sind viele Zellen selbst in der Lage TGF- β über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus zu produzieren.

Der TGF- β ₁ Subtyp ist in den meisten Geweben vorhanden. Sein Anteil in der Wundflüssigkeit liegt bei 85%, in den α -Granula der humanen Thrombozyten sogar bei 100 % (21). Die Expression von TGF- β ₁ wird durch Prozesse wie Wundheilung, Ischämie, Anoxie, Karzinogenese und Fibrose erhöht.

Schon lange ist TGF- β als ein Fibrose induzierendes Molekül bekannt. Die Applikation von exogenem TGF- β auf Schnittwunden konnte sowohl eine deutlich Steigerung des Kollagengehaltes als auch eine Verstärkung der Reißfestigkeit bewirken (66). Eine Transfektion mit TGF- β DNA oder eine singuläre systemische Gabe von TGF- β vor der Wundsetzung konnte bei Ratten ebenfalls die Wundheilung verbessern (10). TGF- β ₁-KO Mäuse dagegen zeigen eine verzögerte Wundheilung, was auf eine Korrelation von TGF- β ₁ und einer suffizienten Wundheilung hinweist (15).

In Zuständen der pathologischen Überproduktion der extrazellulären Matrix, wie bei hypertrophierten Narben von Brandwunden und einer Lungenfibrose nach therapeutischer

Bestrahlung, konnte eine sehr hohe Expression dieses Zytokines in den betroffenen Geweben gezeigt werden (21, 45, 110, 126, 128). Dagegen ist ein Fehlen oder eine systemische Überexpression dieses Botenstoffes mit dem Leben nicht vereinbar (48). Patienten mit einem diabetischen Fußsyndrom zeigen eine verminderte TGF- β_1 Expression in den Wunden (53).

Eine besondere Rolle scheint TGF- $\beta_{1,3}$ bei der fetalen Wundheilung zu spielen, die im Gegensatz zu den adulten Wunden narbenfrei ausheilt (26). Nach Gabe von TGF- β kommt es bei der fetalen Wundheilung zur Narbenbildung. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung von adulten Wunden mit anti-TGF- β Antikörpern zu einer Reduzierung der Narbenbildung. Dies unterstreicht die Rolle dieses Zytokins für die Matrixsynthese- und Regulation

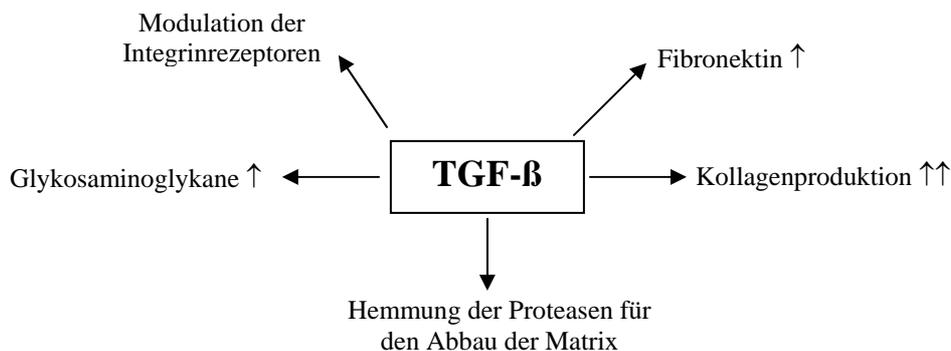


Abb. 6: Einfluss von TGF- β auf die extrazelluläre Matrix während des Reparaturprozesses der Wundheilung (48)

2 Fragestellung

Basierend auf Ergebnissen, dass Arginin in der Wundheilung sowohl über Arginase als auch über iNOS metabolisiert wird und auf der Tatsache, dass Fibroblasten in der Wundheilung eine phänotypische Wandlung durchmachen, war es Ziel zu untersuchen, ob sich normale Haut- von Wundfibroblasten hinsichtlich der Expression der Arginase Isoformen unterscheiden (3, 4, 97).

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Regulation der Expression von Arginase und iNOS durch die Zytokine TGF- β_1 und IL-4 beeinflusst wird und ob es in den beiden Fibroblastentypen Unterschiede bezüglich dieser Regulation gibt. Dieser Punkt sollte eine mögliche Verbindung zwischen dem profibrotischen Effekt der beiden Zytokine und der Arginase Expression unterstreichen.

Des Weiteren sollte die Expression des Arginin-Transporters CAT-1 in den Fibroblasten untersucht werden.

Für die Fragestellung wurden aus Ratten gewonnene normale Haut- und Wundfibroblasten *in vitro* kultiviert und gemeinsam mittels RT-PCR untersucht.

3 Material und Methoden

Alle mit * gekennzeichneten Materialien werden im Kapitel 3.5 „Genaue Materialbezeichnung“ ausführlich beschrieben.

3.1 Operation der Tiere

Zur Gewinnung der Zellen wurden für unsere Versuche ausschließlich gesunde, männliche Lewis Ratten mit einem Gewicht zwischen 240-260 g verwendet (Charles River, Deutschland). Diese Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten, d.h. in einem 12 h Tag-Nacht- Rhythmus, bei 21°C und sie erhielten Futter und Wasser ad libitum. Der Tierversuchsantrag wurde vom Regierungspräsidium genehmigt.

3.1.1 Gewinnung von normalen Hautfibroblasten (NFB)

Um eine heterogene Zellpopulation zu gewinnen, wurden immer zwei Tiere für einen Versuch benutzt. Die Ratten wurden mit Enflurane sediert und nach Abschluß der Versuche mit einer intraperitonealen Überdosis des Gemisches Rompun 2%/ Ketanest 5% (Zusammensetzung siehe Tab.: 2) getötet. Anschließend wurde auf dem Rücken der Tiere eine 5 cm x 10 cm große Fläche rasiert und dieses Hautareal steril herauspräpariert. Bei diesem Schritt wurde die komplette Hautdecke entnommen, bestehend aus der Epidermis, Dermis und Subkutis. Im nächsten Schritt wurde auf der sterilen Arbeitsfläche unter der Sterilbank die Subkutis chirurgisch entfernt.

Anschließend wurde das gewonnene Hautstück der Ratte auf Stücke der Größe 0,5 cm x 0,5 cm zerkleinert und mehrmals in Zellkulturmedium gewaschen. Um einen besseren Halt der Hautstücke zu bekommen, wurde 10 Kreuze auf den Boden jeder 100mm grossen Petrischale* mit einem sterilen Skalpell eingeritzt. Die präparierten Hautstücke wurden auf die Mitte der Kreuze platziert, mit 1ml Complete Medium* (CM) benetzt und bei 5 % CO₂, 37° C, 24 h inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zu jeder Petrischale soviel CM hinzugefügt, dass die einzelnen Hautstücke mit CM verbunden waren. Nach weiteren 24 h wurde nochmals CM dazugegeben, bis das Medium den ganzen Boden bedeckte. Das Medium wurde nun alle vier Tage gewechselt (7ml frisches CM pro Petrischale) und unter mikroskopischer Kontrolle das Auswachsen der Fibroblasten kontrolliert. Nach ausreichender Proliferation wurden die Hautstücke entfernt und die Zellen weiter unter normalen

Zellkulturbedingungen (alle vier Tage Mediumwechsel, 37°C, 5 % CO₂) bis zur Konfluenz kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden diese passagiert (siehe Kapitel 6.2.2 Zellkultur) und in 75 cm Zellkulturflaschen* neu ausgesät.

3.1.2 Gewinnung der Wundfibroblasten (WFB)

Unter intraperitonealer Rompun/ Ketanest Narkose (Zusammensetzung s. Tab.:2), wurde ebenfalls eine 5 cm x 10 cm große Fläche auf dem Rücken der Tiere rasiert und das OP-Gebiet mit Betaisadona steril gesäubert. Nun wurde entlang der Wirbelsäule eine 8 cm lange Hautinzision durchgeführt. Zu beiden Seiten wurden subkutan 15 Taschen für die Schwämmchen präpariert. In diese Taschen wurde jeweils ein PVA-Schwamm* platziert. Die Schwämme wurden zuvor 10 min in 0,9% NaCl zur Sterilisation gekocht und anschließend mit lauwarmen 0,9% NaCl abgekühlt. Vor der Implantation wurden die Schwämme leicht ausgedrückt. Nachdem die Schwämmchen platziert worden waren, wurde die Hautinzision mit Klammern verschlossen.

Tab. 3: Dosierung der Medikamente für die Anästhesie der Tiere

<i>Gewicht in g</i>	<i>Rompun 2% in ml</i>	<i>Rompun 2% in mg</i>	<i>Ketanest 5% in ml</i>	<i>Ketanest 5% in mg</i>
230	0,12	2,3	0,46	23
240	0,12	2,4	0,48	24
250	0,13	2,5	0,50	25
260	0,13	2,6	0,52	26
270	0,14	2,7	0,54	27
280	0,14	2,8	0,56	28
290	0,15	2,9	0,58	29

Die Schwämmchen wurden an den Tagen 3, 5, 7, 10, 21 nach Implantation wieder explantiert. Hierfür wurden immer mindesten zwei Tiere am gleichen Tage operiert. Nachdem die Ratten getötet, rasiert und die Wunden steril gesäubert worden waren (s.o.), wurde die ehemalige Hautinzision wieder eröffnet und die Schwämmchen freipräpariert. Anschließend wurden die gewonnenen Schwämmchen von je einer Ratte in ein steriles 50 ml Röhrchen* überführt. Das Röhrchen enthielt 12 ml warmes CM, welches zusätzlich mit Kollagenase* (200 U/ml) versetzt war. Die Schwämme wurden über Nacht im kollagenasehaltigem Medium inkubiert, um die Pseudokapsel, die sich um die Schwämme gebildet hatte, anzudauen und damit die Zellen besser extrahieren zu können. Danach wurden die Schwämmchen mit speziellen Pinzetten (sog. 'Russian forceps') unter sterilen

Bedingungen ausgequetscht und die gewonnene Flüssigkeit, die die Wundfibroblasten enthielt, aufgefangen. Die Schwämmchen wurden nun in vorgewärmtem (37 °C) CM getränkt und abermals ausgequetscht. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Die Zellen wurden anschließend zweimal im CM gewaschen und jeweils bei 24°C und 200 RPM für 10 min zentrifugiert. Dann wurde das Pellet wieder in CM resuspendiert und je ein Milliliter der Suspension in eine Falcon Kulturflasche* pipettiert. Diese wurde nun mit 12 ml CM aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert. Alle vier Tage wurde das CM erneuert. Die Zellkulturen wurden unter dem Mikroskop optisch auf ihr Wachstum und eventuelle Kontaminationen überprüft.

3.1.3 Gewebeentnahme der Leber und Niere

Nach Tötung der Tiere (s.o.) wurde der Bauch der Tiere rasiert und das OP- Gebiet mit Betaisadonna steril gesäubert. Danach wurde eine Laparotomie zur Freilegung der Leber durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde ein 1 x 1 cm großes Gewebe der Leber entnommen. Im Anschluss wurde eine Niere freigelegt und auch von diesem Organ wurde eine 1 x 1cm großes Gewebestück steril entnommen. Diese Gewebeprobe wurde in ca. 100 - 150 mg schwere Stücke zerkleinert und getrennt in Röhrchen* überführt, die mit 1 ml Trizol* gefüllt waren. Dieses Gemisch wurde entweder für eine spätere Verwendung bei -80 °C eingefroren oder gleich im Anschluss in Rahmen der RNA-Gewinnung (Kap. 6.3.2) weiterverarbeitet.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Standardbedingungen

Alle Zellen wurden immer nach dem gleichen Protokoll kultiviert, d.h. es wurden ausschließlich die gleichen, sterilen Falcon Gewebekulturflaschen*, Falcon Röhrchen*, Pipetten*, Brutschränke*, PBS* und das gleiche Complete Medium* (CM, siehe Tab. 4) verwendet.

Alle vier Tage wurde ein Mediumwechsel vollzogen, d.h. bei den 75 cm² Flaschen wurde nach dem Abnehmen des alten Mediums wieder 12 ml CM, bei den 150 cm² Flaschen 24 ml CM und bei den 100 mm Petrischalen 7 ml hinzugefügt. Vor dem Mediumwechsel wurden die Kulturen visuell und mikroskopisch auf Wachstum, Vitalität und auf eventuelle Kontaminationen überprüft.

Tab. 4: Zusammensetzung des Complete Mediums (CM)

<i>Substanz</i>	<i>Menge in ml</i>
Dulbeccos modified Eagles Medium*	500
Fetales Kälberserum (FCS)*	50
Penicillin/Streptomycin*	5
Amphotericin*	2,5

Alle Flüssigkeiten, die mit den Zellen in Berührung kamen, wurden zuvor auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Alle Arbeiten (Mediumwechsel, Passagieren und Stimulierung) erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Alle Zellen wurden in den Brutschränken bei 37° C und 5 % Vol. CO₂ kultiviert.

3.2.1.1 Heterogenität der Zellen

Damit bei den Versuchen keine klonalen Zellen zur Anwendung kamen, mussten die Zellen gepoolt werden. Das bedeutet, dass die Zellen aus einer Versuchsreihe (z.B. Wundfibroblasten vom 5. Tag) immer von mindestens zwei unterschiedlichen Tieren stammten.

3.2.1.2 Passagieren der Fibroblasten

Die Zellen wurden passagiert, wenn sie konfluent waren. Konfluenz bedeutet, dass der gesamte Boden der Gewebekulturflaschen mit einer einzelnen Schicht von Fibroblasten bedeckt ist. Dann wurde das alte Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS*) gewaschen. Danach wurden 2 ml (Petrischalen), 3 ml (75 cm² Gewebekulturflaschen) bzw. 4 ml (150 cm² Gewebekulturflaschen) warmes Trypsin* hinzugefügt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde das Ablösen der Zellen von der Unterfläche kontrolliert und anschließend zur Antagonisierung des Trypsin die doppelte Menge CM* hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in einem 50 ml Röhrchen bei 24°C und 200 RPM, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in CM resuspendiert. Dabei wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 passagiert, d.h. der Inhalt einer Flasche wurde auf vier Flaschen verteilt.

3.2.1.3 Einfrieren der Zellen

Für spätere Versuche wurde ein Teil der NFB und WFB nach Protokoll eingefroren.

Die Zellen wurden zunächst bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend passagiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt, und die Zellzahl mittels der Neubauer Kammer bestimmt. Durch Trypanblaufärbung wurden die abgestorbenen Zellen nicht mitgezählt. Die Zellkonzentration wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = ([\text{Zellzahl aller vier Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor}] / 4) \times 10^4$$

Die Zellsuspension wurde bei 24°C und 200 RPM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Einfriermedium 1 aufgelöst, so dass eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/500µl erreicht wurde. 500µl dieser Zellsuspension wurde in spezielle Röhrchen* überführt. Hierzu wurden nun je 500 µl des Einfriermediums 2 hinzupipettiert und 3 mal zum Mischen auf - und abpipettiert. Das Gemisch wurde nach einem 3-Stufenverfahren eingefroren: 24 h bei -20° C, die folgenden 24 h bei -80° C und dann bei -80° C bis zum Auftauen im Stickstofftank gelagert.

- Einfriermedium 1: 5,25 ml DMEM*, 4 ml FCS*, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin, 0,25 ml Amphotericin
- Einfriermedium 2: 8 ml CM*, 2 ml DMSO*

3.2.1.4 Auftauen der Zellen

Aus dem Stickstofftank wurden die bei -180° C eingefrorenen Zellen entnommen und im Wasserbad aufgetaut. $1-2 \times 10^6$ Zellen wurden zu einer mit vorgewärmten CM befüllten Gewebekulturflasche hinzupipettiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um die zelltoxische Wirkung des DMSO zu beseitigen. Dann wurden die Zellen nach der Standardmethode kultiviert.

3.2.2 Stimulation der Zellen mit Zytokinen

Für die Stimulationsversuche wurden NFB oder WFB in 100 mm² große Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Vor der Stimulation wurde das alte Medium abgezogen und durch 5 ml neues CM* ersetzt. Die aliquotierten Zytokine wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sofort auf Eis gelagert und der Rest so schnell wie möglich wieder bei -20°C eingefroren. Die Applikation der Zytokine erfolgte nach folgenden Schemata:

Tab. 5: Konzentrationsreihe der Zytokine für die Stimulationsversuche**Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1)**

<i>Nr.:</i>	<i>TGF-β_1</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>
1	Kontrolle	--	--
2	5 μ l	0,1 ng/ μ l	0,1 ng/ ml
3	50 μ l	0,1 ng/ μ l	1,0 ng/ ml
4	250 μ l	0,1 ng/ μ l	5,0 ng/ ml

Interleukin - 4 (IL - 4)

<i>Nr.:</i>	<i>IL - 4</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>
1	Kontrolle	--	--
2	5 μ l	1,0 ng/ μ l	1 ng/ ml
3	50 μ l	1,0 ng/ μ l	10 ng/ ml
4	250 μ l	1,0 ng/ μ l	50 ng/ ml
5	500 μ l	1,0 ng/ μ l	100 ng/ ml

Für die Versuche mit IL-4 wurden die Zellen 6h unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Versuche mit TGF- β_1 wurden die Zellen der ersten Versuchsreihe 24h und in der zweiten 6h nach Zugabe von TGF- β_1 kultiviert. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgezogen, die Zellen zweimal mit je 5 ml kaltem PBS* gewaschen und anschließend sofort die RNA-Isolierung vollzogen (Kap. 6.3.2).

Für den Zeitintervallversuch wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Die Proben wurden ebenfalls nach Ablauf der Stimulationszeit mit je 5 ml kaltem PBS* zweimal gewaschen und - wie im Kap. 3.3.2 (RNA Gewinnung) beschrieben - weiterbehandelt. Die Kontrolle wurde nach 24 Stunden weiterverarbeitet.

Tab. 6: Konzentrationsreihe der Zytokine bei der Stimulation der Zellen in Abhängigkeit der Zeit

<i>Versuchsnr.:</i>	<i>Stimulationszeit</i>	<i>IL-4*</i>	<i>Endkonz.</i>	<i>TGFβ-1**</i>	<i>Endkonz.</i>
1	Kontrolle	--	--	--	--
2	2	250 μ l	50 ng/ml	250 μ l	5 ng/ml
3	4	250 μ l	50 ng/ml	250 μ l	5 ng/ml
4	6	250 μ l	50 ng/ml	250 μ l	5 ng/ml
5	12	250 μ l	50 ng/ml	250 μ l	5 ng/ml
6	24	250 μ l	50 ng/ml	250 μ l	5 ng/ml
7	48	250 μ l	50 ng/ml	250 μ l	5 ng/ml

* IL-4 Konzentration: 1ng/ μ l , **TGF- β 1 Konzentration: 0,1 ng/ μ l

3.3 Molekularbiologischer Teil

3.3.1 Standardbedingungen

In den Versuchsreihen wurden ausschließlich die gleichen Reagenzien und Materialien verwendet. Um eine Kontamination der Proben mit DNA, DNAsen, RNA und RNAsen, zu verhindern, wurde immer mit Handschuhen* gearbeitet und alle Materialien sterilisiert. Die RNA wurde bei - 80° C und die DNA bei -20° C gelagert und nur für die Zeit der Versuche aufgetaut und während der Weiterverarbeitung immer auf Eis gelagert, um einem Zerfall der Proben vorzubeugen.

3.3.2 Gewinnung der RNA

Am Ende des Stimulationsversuchs und nach zweimaligem Waschen der Petrischalen mit PBS wurden zu jeder Petrischale 1000 µl Trizol[®]* pipettiert und die Zellen mechanisch mit einem sterilen Schaber* von ihrer Unterlage gelöst und anschließend die Suspension mit den Zellen in ein Eppendorf Röhrchen* überführt. Nun wurden 200 µl Chloroform* pro Röhrchen hinzugefügt, 15 s per Hand stark geschüttelt und 3 min auf Eis inkubiert. Bei 4°C und 14 000 RPM wurden die Proben anschließend für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen (von unten nach oben): 1. die violett gefärbte Phenolphase entsprach dem Gesamt-Protein der Zellen, 2. die graue, dünne Interphase beinhaltete die Gesamt-DNA und 3. die obere, klare Phase entsprach der Gesamt- RNA. Die dritte Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Röhrchen* überführt. Um die RNA zu fällen, wurden 500 µl eiskaltes 100% Isopropanol* hinzugegeben, 5 Sek. gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden wieder bei 4° C, 14 000 RPM für 10 min zentrifugiert. Das ausgebildete Pellet stellt die Gesamt-RNA dar. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 700 µl 70%, eiskaltem Ethanol* gewaschen und die Proben wieder bei 4° C, 14 000 RPM für 8 min zentrifugiert. Nach vorsichtiger, kompletter Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 45 µl Ampuwa* gelöst. Um eine Kontamination der Pipetten zu verhindern, wurden für diesen Schritt nur gestopfte Pipettenspitzen* verwendet.

3.3.3 DNase Verdau

Um eine mögliche Kontamination der RNA mit DNA auszuschließen, wurde die RNA vor dem Umschrieb in DNA durch DNase-Verdau gereinigt. Hierbei wurde nach folgendem

Protokoll vorgegangen:

Zuerst wurde jede Probe mit dem Spektrophotometer* vermessen (Kap. 6.3.4) und die RNA Konzentration bestimmt. Anschließend wurden 38 μl der Probe in ein neues 1,5 ml Röhrchen* überführt. Zu diesem wurden 62 μl des folgenden DNase Mixes (Tab. 6) hinzupipettiert, 5 s gevortext, 3 s heruntergesponnen und bei 25°C für 20 min im Wärmeblock* inkubiert.

Tab. 6: DNase Mix

<i>Material</i>	<i>Menge (in μl)</i>
Ampuwa*	56,4
3 M NaAcetat pH 5,2	3,3
1 M MgCl ₂	0,5
DNase* 10 units/ μl	1,8

Zur Fällung der RNA wurden pro Röhrchen 10 μl 3M NaAcetatlösung und 250 μl eiskaltes 100% Ethanol hinzugefügt und diese Probe 5 s gevortet, 3 s heruntergesponnen und bei -20°C über Nacht gefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4°C, 14 000 RPM für 15 min zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig per Pipette abgenommen, so dass nur das Pellet im Röhrchen zurückblieb. Das Pellet wurde erneut mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, anschließend in Ampuwa aufgelöst und die RNA auf eine Konzentration von 200 ng/ μl eingestellt.

3.3.4 Vermessung der RNA Proben

Die RNA wurde bei 260 nm spektrophotometrisch* vermessen. Hierfür wurden 4 μl Probe 1:20 mit Ampuwa verdünnt. Bei jeder Vermessung wurde ein Standard, bestehend aus Heringssperma in einer Konzentration von 110 ng/ μl , zur Abgleichung vermessen.

3.3.5 Überprüfung der RNA Qualität

Um die Qualität der RNA vor dem Umschrieb in DNA zu untersuchen, wurden 1-2 μl RNA mittels Gelelektrophorese untersucht. Dieser Schritt wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Herstellung der benötigten Reagenzien:

Tab. 8: Herstellung des MOPS 10x Puffers

<i>Material</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
MOPS	20,9 g	
H ₂ O	400 ml	--
<i>Einstellen auf pH 7,0 mit NaOH</i>		
Natriumacetat	8,3 ml	3 M

EDTA* (ph 8,0)	10 ml	0,5 M
<i>auf 500 ml mit dest. Wasser auffüllen und mit einem Millipore 0,2µ Filter steril filtrieren und zum Schutz gegen Licht mit Aluminiumfolie ummanteln</i>		

Tab. 9: RNA - Beschwerungspuffer

<i>Material</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
H ₂ O	10 ml	--
Ficoll	3 g	
Bromphenolblau	25 mg	

Tab. 10: Probenpuffer

<i>Material</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
Formamid	93,8 µl	
MOPS	18,8 µl	10X
Formaldehyd	30,0 µl	37 %

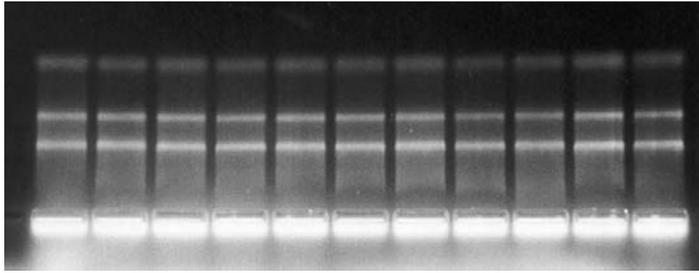
5 µl DNase verdaute Gesamt-RNA (entspricht 1µg RNA) und 7,8 µl Probenpuffer* (s. Tab. 10) wurden in ein neues PCR-Röhrchen* überführt, bei 70° C für 10 min denaturiert und anschließend 10 min auf Eis gelagert. Die Proben wurden daraufhin mit 3,5 µl einer Mischung aus 2,0 µl Beschwerungspuffer* und 1,5 µl 1:10 verdünnter Ethidiumbromidlösung* versetzt und mit der Pipette gemischt.

Für die Auftrennung der RNA im Agarose-Gel wurde das Gel folgendermaßen hergestellt:

Tab. 11: RNA-Gel

<i>Material</i>	<i>Menge</i>	<i>Konzentration</i>
Agarose*	0,25 g	
Ampuwa dest.	18,25	--
MOPS	2,50 ml	10 x
Formaldehyd*	4,25 ml	35 %

Das in die Gelkammer* gegossene Gel wurde mindestens eine halbe Stunde zum Auspolymerisieren unter den Abzug gestellt. Nun wurde das Gel mit 1x MOPS-Puffer überschichtet und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Positiv-Kontrolle wurde eine bereits getestete gesamt RNA-Probe verwendet. Die Proben wurden nun bei 80 Volt und 110 mA für 1h aufgetrennt und danach unter UV-Licht mittels Polaroidphoto dokumentiert.(siehe Abb. 7)



5 s - RNA
18 s - RNA
28 s - RNA

Abb. 7: Beispiel für ein RNA-Gel. Die Auftrennung der RNA zeigt bei „sauberer“ RNA die 3 Banden 5s, 18s und 28s.

3.3.6 Die Reverse Transkription

Um die gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben, wurde wie folgt vorgegangen:

4,0 µl RNA wurden mit 2,0 µl Random Primer* bei 70° C für 10 min inkubiert und anschließend 10 min auf Eis gelagert. Zu diesem Gemisch wurde der RT-Mix (Tab.12) hinzugefügt, 5s gevortext und 3s abgesponnen und 1h bei 42 C° im Amplifier* zur Reaktion gebracht.

Tab. 12: Reverse Transkription - Mix (RT-Mix)

<i>Material</i>	<i>Menge (in µl)</i>	<i>Konzentration</i>
Ampuwa	7,5	--
Buffer (AMV-RT 5 x)*	5	5 x
dNTP's*	2,5	25 mM
RNAsin*	1	40 U/ µl
RT-AMV*	3	9 U/ µl

3.3.7 Aufreinigung der cDNA

Für die Aufreinigung der gewonnene cDNA wurde das Protokoll des Herstellers des PCR Purification Kit* verwendet. Zuerst wurde zu jeder 25µl Probe 125µl des Puffer-1 hinzugegeben und dieses Gemisch wieder 5s gevortext und 3s abgesponnen. Dieser Mix wurde dann auf die Aufreinigungssäulen überführt und bei 4°C, 14 000 RPM für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säulen zweimal mit je 700µl Puffer-2 beschichtet und wieder bei 4 C°, 14 000 RPM für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde jeweils verworfen. Im nächsten Schritt werden die Säulen ohne Zusatz für eine Minute zentrifugiert und somit getrocknet. Die Reinigungssäulen wurden nun bei Raumtemperatur 5 min getrocknet und anschließend mit je 50 µl des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffer beschichtet, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wieder bei 4°C, 14 000 RPM, 1 min zentrifugiert. Das Eluat bestand aus der aufgereinigten cDNA. Diese wurde analog zur

RNA vermessen und auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt und bei -20°C gelagert.

3.3.8 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Expression für AI, AII, iNOS und CAT in den NFB und WFB wurde mittels PCR untersucht. Hierzu wurden spezifische Primer* speziell für diese Versuchsreihen angefertigt. Die Basensequenz der Enzyme wurde aus der Internetdatenbank (<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>) entnommen. Die besten Primersequenzen wurden mit dem Computerprogramm PC Gene® errechnet. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Roth GmbH. Die PCR vervielfältigt nach folgendem Schema die cDNA:

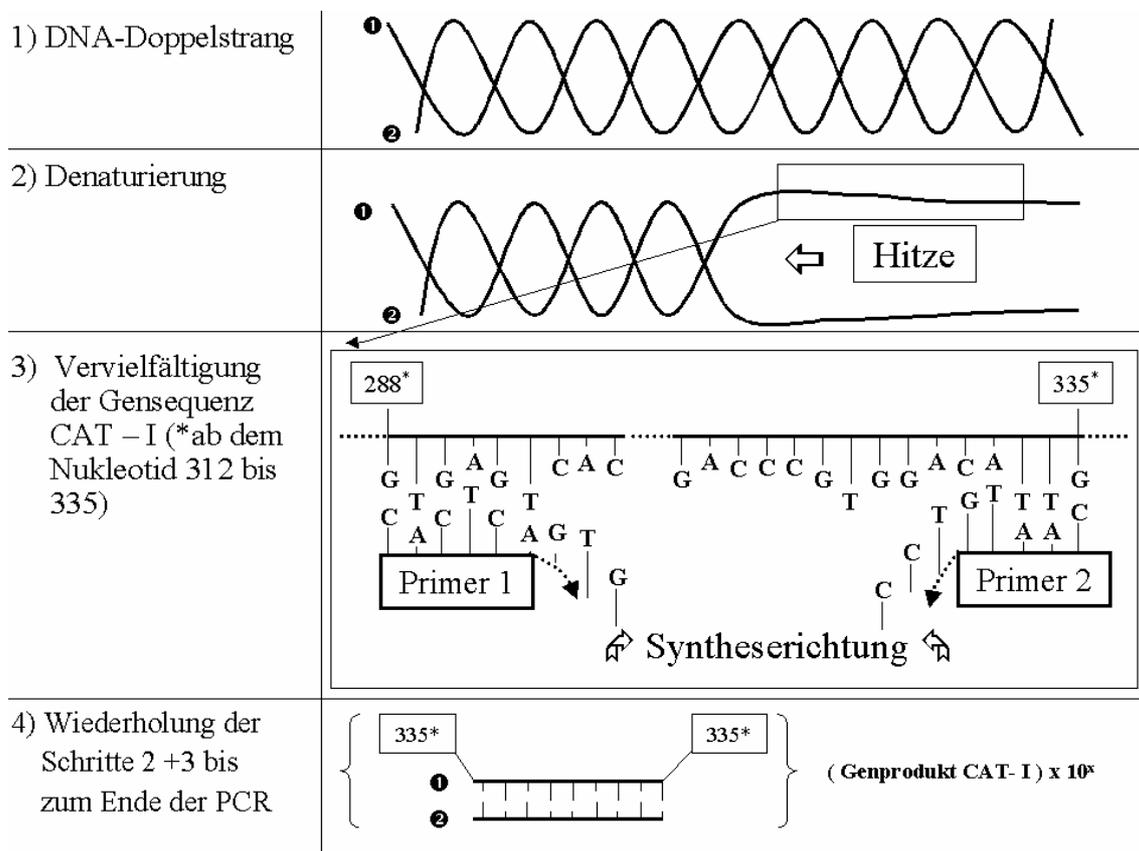


Abb. 10: Stark vereinfachter Ablauf einer PCR:1) Der Doppelstrang wird durch die 2) Hitze aufgesprengt damit die spezifisch wirkenden Primer 3) sich an die DNA-Sequenz anlagern können, um mit Hilfe von Enzymen (nicht abgebildet) den komplementäre DNA-Einfachstrang ❶ im Abschnitt 312 – 335 zu synthetisieren. Auf die gleiche Art wird der komplementäre DNA-Einfachstrang ❷ vervielfältigt. Schritt 2) + 3) werden so oft wiederholt, dass am Ende der PCR der 4) spezifische DNA- Doppelstrang, der nur die ausgewählte Sequenz enthält, 10^x mal produziert worden ist.

3.3.9 GAPDH – PCR

Um die cDNA auf eventuell entstandene Schäden zu kontrollieren, wurde diese einer Kontroll-PCR unterzogen. Hierfür wurde das Enzym GAPDH (**G**lycerinaldehyd-**p**hosphat**D**ehydrogenase) eingesetzt, da dieses in hoher Quantität in allen Zellen vorhanden ist. Wäre ein Schaden entstanden, würde man das an der Abnahme der Lichtintensität der Banden im Gel erkennen. Hierfür wurden 100 ng cDNA Probe mit PCR Mastermix (Tab. 12) versetzt, 5s gevortext, 3s heruntergesponnen und anschließend mit einem Tropfen Öl* beschichtet. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte mittels dem PCR-Programm: GAPDH (Tab.13).

Primersequenzen für GAPDH:

+ Primer: 5` GTG GAG TCT ACT GGC GTC TTC 3`

- Primer: 5` CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT 3`

Tab. 12: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für die GAPDH-PCR

<i>Menge in µl</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konz.</i>
33,4	Ampuwa	--
5,0	10 x Buffer* für PCR	10x
0,4	d NTP's*	25 nM
0,5	Primer 1* (+)	100 ng/µl
0,5	Primer 2* (-)	100 ng/µl
0,2	Taq*	5U/µl

Nach der Multiplikation der cDNA für GAPDH wurden 10µl des Reaktionsgemisches in ein neues Eppendorf überführt und mit 2,5 µl DNA Laufpuffer 3s heruntergesponnen. Der DNA-Laufpuffer setzte sich aus den Komponenten der Tab. 14 zusammen. 12,5µl wurde nun zur Auftrennung und zur Detektion in die Geltaschen des 2%-igen Agarose-Gels (Zusammensetzung Tab.16) pipettiert, welches zuvor mit einer 1 % TAE-Lösung (Zusammensetzung Tab.15) überschichtet worden war.

Tab. 13: PCR - Programm für die GAPDH - PCR

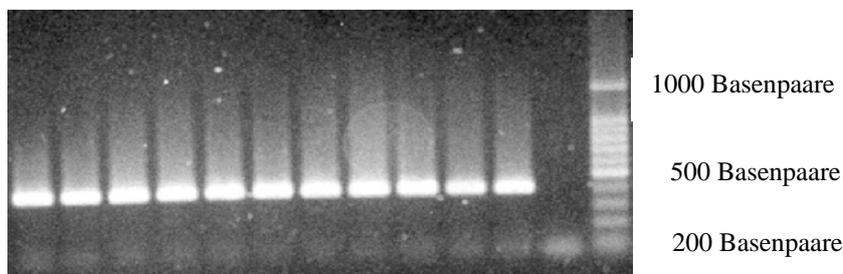
Schritt 1	94° C	4:00 min
Schritt 2	94° C	1:00 min
Schritt 3	59° C	1:00 min
Schritt 4	72° C	1:00 min
Schritt 5	72° C	10:00 min
Schritt 6	4° C	bis Abbruch

34 Wiederholungen

Tab. 14: DNA - Laufpuffer

<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
0,5 ml	1 M Tris* pH 7,6	50 mM
1,0 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	50 mM
0,5 ml	SDS	0,5 %
10 mg	Bromphenolblau	0,1 %
4 g	Sacharose	40 %
ad.10 ml	Wasser*	
steril filtrieren (0,22 µm Poren)		

Die Auftrennung der cDNA im Agarose Gel geschah bei 130 V, 110 mA \pm 10 über eine Laufzeit von 1 h \pm 15 min. Nach diesem Schritt wurde das Gel zur Anfärbung der cDNA 10 min in eine Ethidiumbromid*-Lösung mit der Konzentration 1 µg/ml eingelegt, anschließend in Wasser 10 min ausgewaschen und unter UV-Licht photographiert (s. Beispiel in Abb. 11).

**Abb. 11:** GAPDH-PCR, Banden 1-10 (von links nach rechts): Proben, Bande 11: Positivkontrolle, Bande 12: Negativkontrolle, Bande 13: Basenstandard**Tab. 15:** 50X TAE Elektrophoresepuffer für DNA

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konz.</i>
Tris*	48,5 g	2 M
Essigsäure*	11,33ml	1M,96%
EDTA*	7,44 g	0,1 M
Wasser	ad 200	
mit Essigsäure* auf einen pH 8 einstellen und autoklavieren		

Tab. 16: 2% Agarose Gel für DNA

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Konz.</i>
Agarose* für DNA	6 g	2%
1 X TAE	300 ml	
Gemisch in der Mikrowelle bei 600 W erhitzen		

3.3.10 Arginase I (Arg I)-PCR

Da die PCR einer Schwankung in Bezug auf ihre Multiplikation der cDNA unterliegt,

wurde die Arginase I PCR standardisiert, um eine semiquantitative Beurteilung der Ergebnisse zu ermöglichen.

3.3.10.1 Standardherstellung von Arginase I

Zur Arg I Standardherstellung wurde aus männlichen Lewis Ratten ein Gewebestück der Leber (siehe Kap. 3.1.3) entnommen und die RNA wie folgt isoliert. 50-100 mg Gewebe wurden in 1000 µl Trizol* 5 min mit Hilfe eines Gewebehomogenisators unter sterilen Bedingungen zerkleinert und mit 200 µl Chloroform gemischt. Die nächsten Schritte waren identisch zu Kap. 3.3.2 (RNA-Gewinnung). Die RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und auf ihre Unversehrtheit überprüft. Nun wurde die erste Arg I PCR mit diesen Proben durchgeführt. 100 ng Probe wurde mit folgendem PCR-Master Mix (Tab. 17) gemischt, mit einem Tropfen Öl* beschichtet und mit dem PCR Programm (Tab. 18) vervielfältigt.

Primersequenz für Arginase I:

+ Primer: 5` GTG GAC AAG CTG GGA ATT GGC 3`

- Primer: 5` TCC CAC ACC CTG AAT TTC ATT CC 3`

Tab. 17: PCR - Master Mix für Arginase I

<i>Substanz</i>	<i>Menge in µl</i>	<i>Konz.</i>
Ampuwa	32,4	--
10 x Buffer* für PCR	5	10x
d NTP's*	0,4	25 nM
Primer 1* (+)	1,0	100 ng/µl
Primer 2* (-)	1,0	100 ng/µl
Taq*	0,2	5U/ µl

Im nächsten Schritt wurden aus mehreren Proben je 40 µl PCR-Produkt in ein neues Eppendorf überführt. Nun wurden die Proben nochmals gereinigt. Hierfür wurde analog zu Kap. 3.3.7 verfahren.

Tab. 18: PCR-Programm für den Arginase I- Standard

Schritt 1	94° C	4:00 min
Schritt 2	94° C	1:00 min
Schritt 3	59° C	1:00 min
Schritt 4	72° C	1:00 min
Schritt 5	72° C	10:00 min
Schritt 6	4° C	bis Abbruch

34 Wiederholungen

Danach wurde die gereinigte cDNA entsprechend dem Protokoll Kap. 3.3.4 aber mit unterschiedlichen Konzentrationen (1:5 und 1:10) vermessen, und das Messergebnis gemittelt. Anschließend wurde das Molekulargewicht der Arginase I cDNA ermittelt:

$$532 \text{ bp} \times 2 \times 330 \text{ g/M} \times 1,66 \times 10^{-24} \text{ M} = 5,83 \times 10^{-19} \text{ g}$$

532 = Basen pro synthetisiertem Arginase I Einfachstrang (x 2 wegen Doppelstrang)

330 = durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids

$1,66 \times 10^{-24} \text{ M}$ = Anzahl der Moleküle/Mol

Aus dieser Gewichtsermittlung konnte dann die Anzahl der Moleküle der vermessenen Proben ermittelt und eine Verdünnungsreihe hergestellt werden:

100.000	Moleküle/ μl
10.000	Moleküle/ μl
1.000	Moleküle/ μl
100	Moleküle/ μl
10	Moleküle/ μl
1	Moleküle/ μl
0,1	Moleküle/ μl

Jetzt wurde das Arg-I PCR Programm (s. Tab. 20) so modifiziert, dass beim Einsatz von 100 ng Arg-I Standard die Probe mit 100 Moleküle/ μl noch zu detektieren waren und die Multiplikation im linearen Bereich war (s. Abb. 11). Somit war es uns immer möglich, die Qualität der Arginase I PCR zu beurteilen.

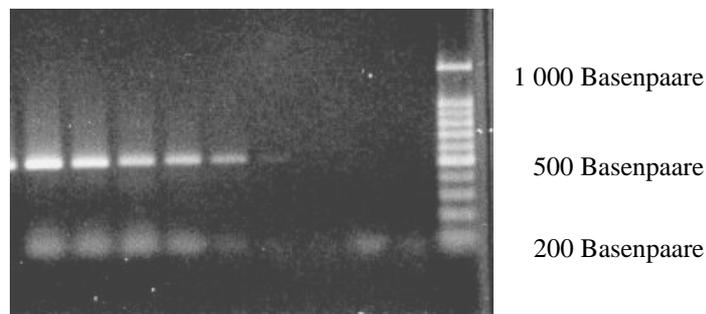


Abb.12: Arginase I Standard (532 bp), Banden von links nach rechts: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 1-Moleküle, \emptyset , Negativkontrolle, Basenpaare

3.3.10.2 Arg I PCR

Es wurden je nach Versuch 20-100 ng Probe und der Standard (immer 100 ng) mit dem PCR- Mastermix AI (Tab.17) gemischt, mit Öl* beschichtet und mit dem PCR-Programm Arginase I (Tab.21) amplifiziert.

Tab. 19: Arg-I PCR Mix

<i>Substanz</i>	<i>Menge in μl</i>	<i>Konz.</i>
Ampuwa*	33,4	--
10 x Buffer* für PCR	5	10x
d NTP's*	0,4	25 nM
Primer 1* (+)	0,5	100 ng/ μ l
Primer 2* (-)	0,5	100 ng/ μ l
Taq*	0,2	5U/ μ l

Tab. 20: PCR-Programm Arg-I

Schritt 1	94° C	4:00 min	
Schritt 2	94° C	1:00 min	31 Wiederholungen
Schritt 3	59° C	1:30 min	
Schritt 4	72° C	1:00 min	
Schritt 6	4° C	bis Abbruch	

10 μ l Amplifikate wurden analog der GAPDH Proben im 2% Agarose Gel detektiert.

3.3.11 Arginase II (Arg II) -PCR

3.3.11.1 Arg II Standardherstellung

Für die Arg II Standardherstellung wurden die Nieren von Lewis-Ratten explantiert, da dieses Organ eine der höchsten Konzentrationen von Arg II im Körper besitzt.

Es folgten die gleichen Schritte wie bei der Arginase I Standardherstellung bis auf folgenden Unterschied: die Berechnung des Molekulargewichtes wurde wie folgt errechnet:

$$280 \text{ bp} \times 2 \times 330 \text{ g/M} \times 1,66 \times 10^{-24} \text{ M} = 3,06768 \times 10^{-19} \text{ g}$$

(Erklärung siehe Arg I Standardherstellung).

Nun wurde die PCR so modifiziert (Tab. 21 und Tab. 22), dass wiederum 100 Moleküle/ μ l detektierbar waren und sich die Vervielfältigung im linearen Bereich befand.

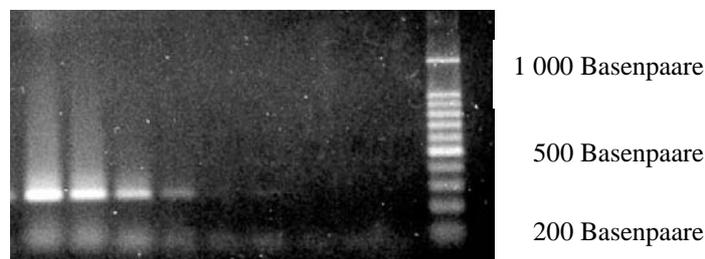


Abb. 13: Arginase II Standard (280 bp), Banden v. links nach rechts: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 1 Moleküle, \emptyset -, Negativkontrolle, Basenpaare

3.3.11.2 Arg II PCR

Um die Proben auf Arg II zu testen, war es notwendig 200 ng einzusetzen, da mit 100ng cDNA kein Signal detektierbar war. Diese wurde mit dem PCR-Master-Mix AII (Tab.21) gemischt, 5s gevortext, 3s heruntergesponnen und mit einem Tropfen Öl* beschichtet. Im Amplifier wurde das PCR-Programm AII (Tab. 22) zur Vervielfältigung gewählt.

Primersequenz Arginase II:

+ Primer: 5` CAC TTC TGA GGA AGA GGC CAA GG 3`

- Primer: 5` AGA GTC CAC AGA TGT TCT CAT TAA GGC 3`

Tab. 21: PCR-Master – Mix Arginase II

<i>Substanz</i>	<i>Menge in µl</i>	<i>Konz.</i>
Ampuwa	23,4	--
10 x Buffer* für PCR	5	10x
d NTP's*	0,4	25 nM
Primer 1* (+)	0,5	100 ng/µl
Primer 2* (-)	0,5	100 ng/µl
Taq*	0,2	5U/ µl

Tab. 22: Arg II PCR Programm

Schritt 1	94° C	4:00 min	
Schritt 2	94° C	1:00 min	34 Wiederholungen
Schritt 3	59° C	1:30 min	
Schritt 4	72° C	1:00 min	
Schritt 6	4° C	bis Abbruch	

10 µl Amplifikate wurden wie oben beschrieben im 2%igen Agarose-Gel detektiert.

3.3.12 iNOS PCR

Für die Analyse der induzierbaren Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression wurden jeweils 100ng Probe eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde die cDNA von Wundfibroblasten Tag 10, die zuvor mit 1µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) und 10 U/ml γ -Interferon (γ -INF) über insgesamt 24h stimuliert wurden, eingesetzt. Für diese PCR verwendeten wir den Mastermix aus Tab. 23.

Primersequenz für iNOS:

+ Primer: 5` TIG GGT CTT GTT AGC CTA GTC

- Primer: 5` TGT GCA GTC CCA GTG AGG AAC

Tab. 23: PCR-Mastermix- iNOS

<i>Substanz</i>	<i>Menge in μl</i>	<i>Konz.</i>
Ampuwa*	32,4	--
10 x Buffer* für PCR	5	10x
d NTP's*	0,4	25 nM
Primer 1* (+)	1	100 ng/ μ l
Primer 2* (-)	1	100 ng/ μ l
Taq*	0,2	5U/ μ l

Tab. 24: PCR-Programm iNOS

Schritt 1	94° C	4:00 min	
Schritt 2	94° C	1:00 min	34 Wiederholungen
Schritt 3	59° C	1:00 min	
Schritt 4	72° C	1:00 min	
Schritt 5	72° C	10:00 min	
Schritt 6	4° C	bis Abbruch	



Auch bei diesem Versuch wurden die Proben analog zu AI, AII im Agarose-Gel aufgetrennt und zur Analyse photographiert.

3.3.13 CAT-1 PCR

Für diese Experimente wurden ebenfalls 20-100 ng cDNA/Probe eingesetzt und folgende PCR etabliert (Tab. 25 und 26):

Primersequenzen für CAT - 1:

+ Primer: 5` CAA TAA TCG CTA CTG TGA CCT CAG GCG 3`

- Primer: 5` CAA TTA GCC CTG AGA ATT TGG ACG GC 3`

Der Mastermix für CAT-1 bestand aus folgenden Substanzen:

Tab. 25: PCR- Mastermix CAT-1

<i>Substanz</i>	<i>Menge in μl</i>	<i>Konz.</i>
Ampuwa*	32,4	--
10 x Buffer* für PCR	5	10x
d NTP's*	0,4	25 nM
Primer 1* (+)	1	100 ng/ μ l
Primer 2* (-)	1	100 ng/ μ l
Taq*	0,2	5U/ μ l

Tab. 26: PCR- Programm CAT-1

Schritt 1	94° C	4:00 min	
Schritt 2	94° C	0:30 min	
Schritt 3	64° C	1:00 min	
Schritt 4	72° C	1:00 min	
Schritt 5	72° C	5:00 min	
Schritt 6	4° C	bis Abbruch	

39 Wiederholungen

Auch bei diesem Versuch wurden die Proben analog zu AI, AII und iNOS im Agarosegel aufgetrennt und zur Analyse photographiert.

3.4 Datenverarbeitung

Um die Lichtintensität der Banden der Gele in Tabellen fassbar zu machen, wurden die Polaroidphotos digitalisiert und mit dem Computer analysiert.

3.4.1 Scannen der Gele

Die Polaroidphotos wurden mit dem Flachbettscanner Cannon D660 U im „Schwarz-weiß Photo fein“ Modus mit 300 dpi gescannt, mit der Software Adobe Photoshop zurechtgeschnitten und als „tif Datei“ abgespeichert.

3.4.2 Analyse der Banden

Für die weitere Analyse der Banden mußte das digitalisierte Photo mit der AIDA Software Aida Image Analyzer V. 3.22 in dem 2- D Modul bearbeitet (Abb. 14) und anschließend in Microsoft Exel in Tabellenform gebracht werden. In der Aida Software wurde das 2D Densitometrie Modul genutzt. In diesem Modul wurden Templates für die Analyse erstellt, d.h. es wurden drei verschiedene Schablonen entworfen, die unterschiedlich große Analyserechtecke besitzen.

Diese Schablonen wurden so ausgerichtet, dass die Analyserechtecke die Banden umschlossen. Pro Schablone wurden jeweils drei Referenzrechtecke bestimmt, die so auf dem Gel platziert worden waren, dass diese einen Durchschnittswert der Eigenreflexion des Agarosegels darstellten. Der Durchschnittswert der Intensität (in [QL]) der drei Referenzrechtecke wurde dann von der Intensität der Probenrechtecke abgezogen, d.h. der Messwert, der in die Ergebnistabellen eingeflossen ist, ist der Wert, bei dem die Hintergrundintensität des Geles abgezogen worden ist.

3.4.3 Bearbeitung der Zahlenwerte

Für die Auswertung wurden nun die Zahlenwerte der Bandenintensität aus den Gelen in der Einheit [QL] in ein Säulendiagramm mit Hilfe der Microsoft Software Exel gebracht.

Die Lichtintensität der Banden im Gel wird in [QL] angegeben. Aus der Lichtintensität der Kontrollen wurde der Mittelwert in [QL] ermittelt. Dieser errechnete Zahlenwert wurde auf 100% gesetzt. Die gemessenen Werte der Proben wurden durch den Mittelwert der Kontrollen geteilt und dadurch erhielt damit eine prozentuale Abweichung in Bezug auf den Mittelwert.

Bandenintensität Kontrolle/Bandenintensität Probe = Ratio in %

Die Ratio wurde nun für den ganzen Versuchsaufbau ausgerechnet und alle Ergebnisse (z.B. alle Ratio der WFB stimuliert mit 5ng/ml TGF- β_1) zusammengerechnet und durch die Anzahl n geteilt und der Durchschnitt in ein Säulendiagramm veranschaulicht. Nun wurde mit dem Excelprogramms die Standardabweichung ausgerechnet und graphisch dargestellt.

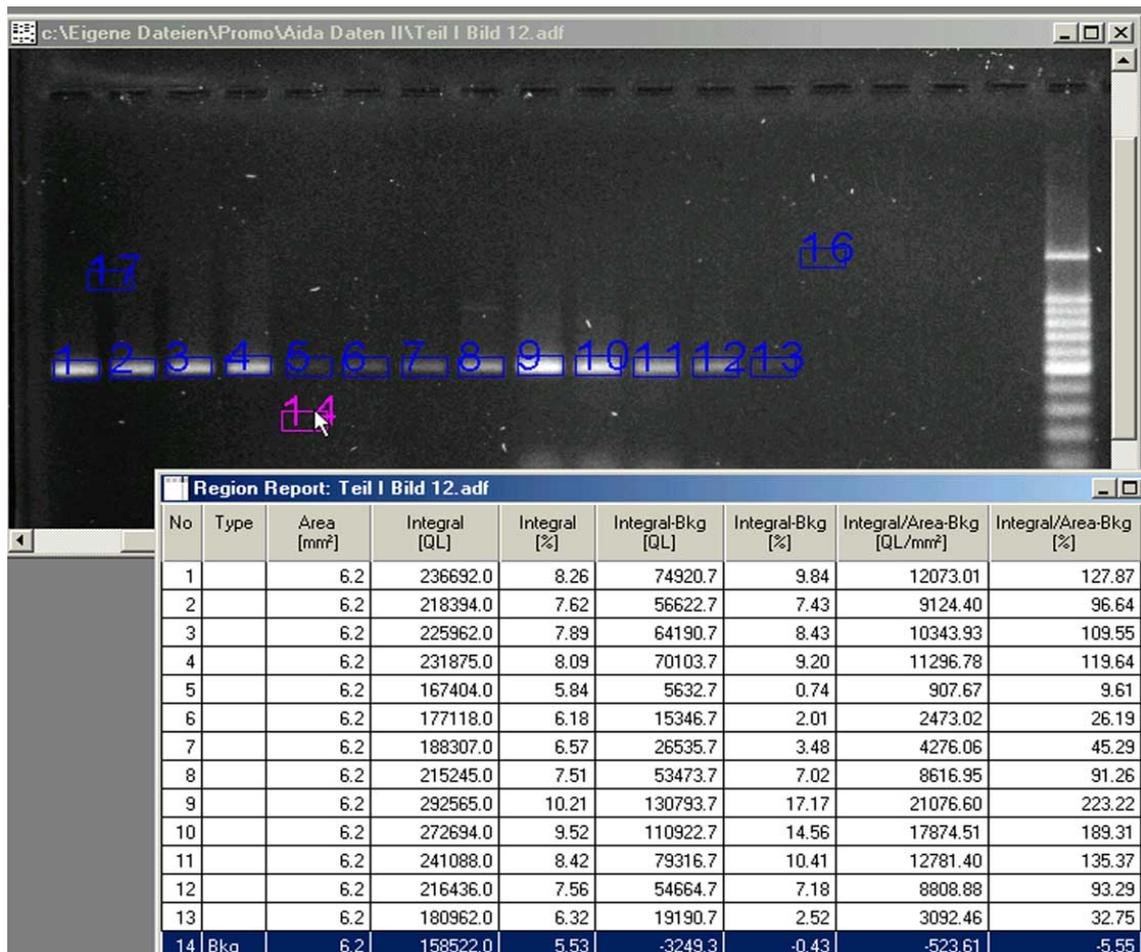


Abb. 14: Darstellung der Bearbeitung der eingescanneten PCR-Gelen mit der Aida-Software. Die Rechtecke 14, 16 und 17 agieren als Referenzwerte für den Background. Die Abb. stellt die Auswertung der Arg I Expression von NFB Passage 2 (Banden 1-4), WFB Tag 10 Passage 4 (Banden 5-8) und Arg I Standard (Banden 9-13) dar.

3.5 Genaue Materialbezeichnung

mit * gekennzeichnetes Material	Firma/genaue Bezeichnung	Konzentration
Agarose	für RNA: Sea Kem, LE Agarose für DNA: Amresco, Agarose 3:1	--
Amphotericin	Gibco, Fungizone	
Amplifier	MJ Research, PTC - 200 Peltier Thermal Cycler	--
Ampuwa	Boehringer Ingelheim: Delta-Pharma aqua ad injectabilia	--
AMV-RT	Promega, AMV Reverse Transcriptase	10 u/ µl
Buffer 10x	Promega, Taq DNA Polymerase 10x buffer mit MgCl ₂	--
Buffer 5x	Promega, AMV RT 5x Buffer	--
Chloroform	Merck, pro analysi, Chloroform	99-99,4 %
Complete Medium (CM)	Zusammensetzung siehe Tab.: 4, S. 20	--
Petrischalen	Falcon 353003 Tissue Culture (100x20mm)	--
DMSO	Sigma, Zellkultur graduiert	
DNA ladder	Promega, 100bp DNA ladder	--
DNase	Boehringer Mannheim, DNase I, RNase free	10 units/ µl
dNTP's	Promega, Set von dATP, dCTP, dGTP, dTTP	
EDTA	Merck, Triplex, Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat für Molekularbiologie	
Essigsäure	Merck, pro analysi Essigsäure	mind 99,0 %
Ethanol	Merck, pro analysi Ethanol	mind. 99,8%
Ethidiumbromid	Amresco, Ethidium Bromid	10 mg/ml

Falkon Zellkulturflaschen 75cm ²	BD Falcon 353136 0.2µm vented blue Plug Seal Cap, Tissue Culture Treated	--
Falkon Zellkulturflaschen 150cm ²	BD Falcon 355001 0.2µm vented blue Plug Seal Cap, Tissue Culture Treated	--
FCS (fetales Kälberserum)	Gibco BRL, Fetal Bovine Serum Lot No. 06Q3501K	
Filter zur Sterilisation	Millex -GP, Syringe Driven Filter Unit, 0.22µm, sterile	--
Formaldehyd	Merck, Formaldehydlösung mind. 35% für Molekularbiologie stabilisiert mit 10% Methanol	35%
Formamid	Roth, Formamid deionisiert	mind. 99,5%
Interleukin 4 (IL-4)	Sigma, Interleukin- 4 von der Ratte, Recombinant, exprimiert in E.coli	5 µg
Isopropanol	Merck, pro analysi isopropanol	mind 99,5 %
Kollagenase	Sigma, Collagenase Lot 9H6843	
Mikroskop	Leica DMIL	--
MOPS 10 X	genaue Zusammensetzung s. Tab. 6	
Öl für die PCR	Sigma, Mineral Oil, M-6904	--
PCR-Purifikations-Kit	Quiagen, QIAquick®, PCR Purification Kit 250, No. 28106	--
PBS	Gibco, Phosphat gepufferte Salz- lösung ohne Calcium und Magnesium	
Penicillin / Streptomycin	Gibco	
Photoapparat	Polaroid, MP 4, Land Camera	--
Photopapier	Polaroid 667	--

Pipettentips mit Filter	Biozym, safeseal tips premium 10µl Art.-Nr.: 692150 Biozym, safeseal tips premium 100µl Art.-Nr.: 692066 Biozym, safeseal tips premium 1000µl Art.-Nr.: 692079	--
Primer	Roth, auf Anweisung fertigen lassen	
PVA- Schwämme	Ivalon (USA), PVA Sponge, Lot. : 9719713	--
Random Primer	Promega, Random Hexamers	500µg/ ml
RNAasin	Promega, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	40 u/µl
RT- AMV	Promega,AMV Reverse Transcriptase	9 U/ µl
Schutzhandschuhe	Kimberly-Clark, SAFESKIN SATIN PLUS, powder-Free Latex Exam Gloves	--
Schaber	Costar, Cell Lifter 3008	
Spectrophotometer	Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000	--
TAE 50x	Zusammensetzung siehe Tab.: 14	--
Taq	Promega, Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B	5 u/µl
Transforming growth factor - β1 (TGF-β1)	Roche, Transforming growth factor- β1, human, recombinant	1 µg/ ml
Tris	Merck, Tris(hydroxymethyl)-amino- methanhydrochlorid, zur Analyse	
Trizol	Life Technologies, Trizol® Reagent	
Trypsin	Life Technologies, Trypsin-EDTA (1X) in HBSS ohne Ca + Mg EDTA	
Trypanblau	Sigma, cell culture Trypan Blue Solution 0.4%	0.4%

Tuben	<p>1) Falcon® 352070, Blue Max™, 50 ml Polypropylene Conical Tube</p> <p>2) Falcon® 352070, Blue Max™, 50 ml Polypropylene Conical Tube</p> <p>3) für RT-PCR: Roth, Ultra-Tube, farblos, 0,65ml Art.-Nr. A774.1</p> <p>4) für Molekularbiologie: Greiner Labortechnik, 500 PP-Reaktionsgefäß 1,5 ml, Cat.No. 616201</p>	--
Wärmeblock	Eppendorf, Thermostat 5320	--
Wasserbad	für Zellkultur: Julabo SW- 20 C	--
Zählkammer	Neubauer, Assistent	--
Zellkulturflaschen	siehe Falcon Flaschen	--
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5417 R	

4 Ergebnisse

4.1 Basale Expression der verschiedenen Enzyme bzw. Transporter

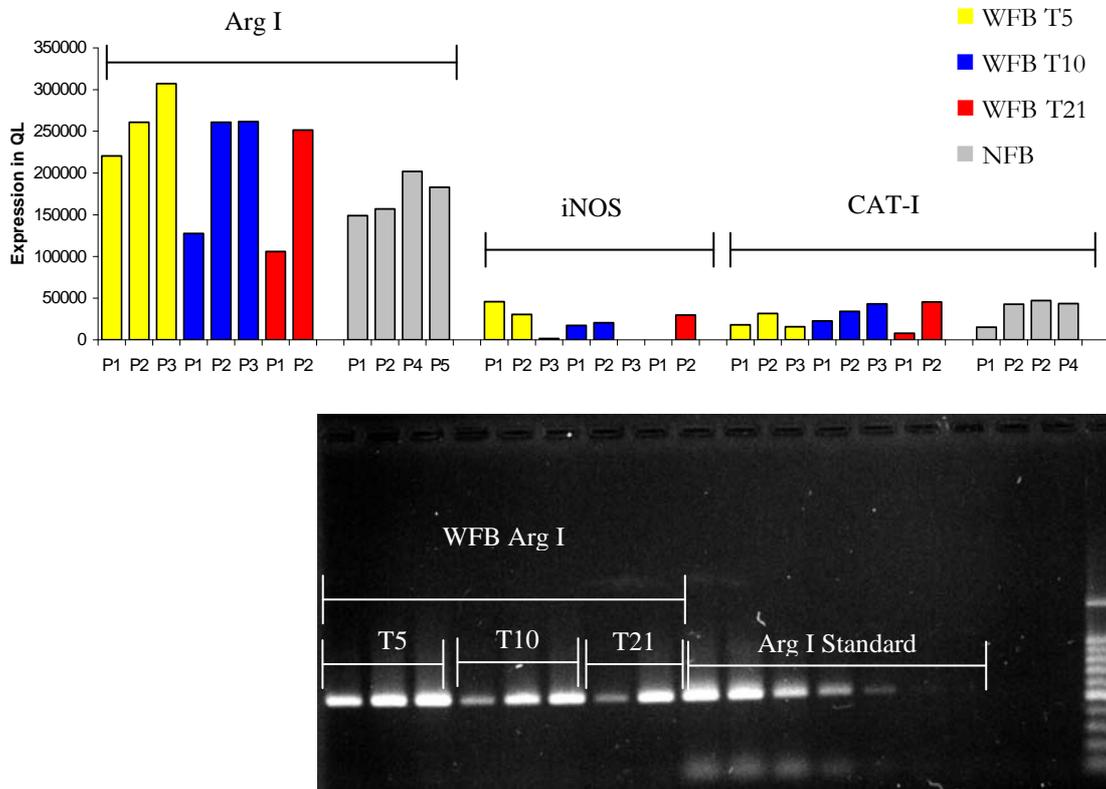


Abb. 4.1 : Darstellung der basalen Expression von Arginase I, iNOS und CAT-I in den unterschiedlichen Wundfibroblasten (WFB) sowie in normalen Fibroblasten (NFB) in Abhängigkeit von ihrer Passage (P1=Passage 1, P2=Passage 2, usw.). Es ist eine deutliche Zunahme der Expression über die Passagen sowohl bei Arg I, als auch bei CAT-I in WFB zu erkennen. Dagegen zeigt sich tendenziell eine Abnahme bei iNOS. Bei den NFB sind dagegen keine eindeutigen Tendenzen der Zu- oder Abnahme erkennbar. Wie bereits aus der Literatur bekannt, ist keine Expression von iNOS in NFB zu finden. Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen den Expressionen der verschiedenen Enzyme ist nicht zulässig, da die Werte aus verschiedenen Versuchen stammen und unterschiedliche Mengen an Material eingesetzt wurde (siehe Material und Methoden). Das Bild zeigt beispielhaft ein PCR Gel mit der Arg I Expression von WFB und dem dazugehörigen Arg I Standard. (T5 = Tag 5, T 10 = Tag 10, T 21 = Tag 21).

4.2 Basale Expression von Arg I, iNOS und CAT in WFB der ersten Passage

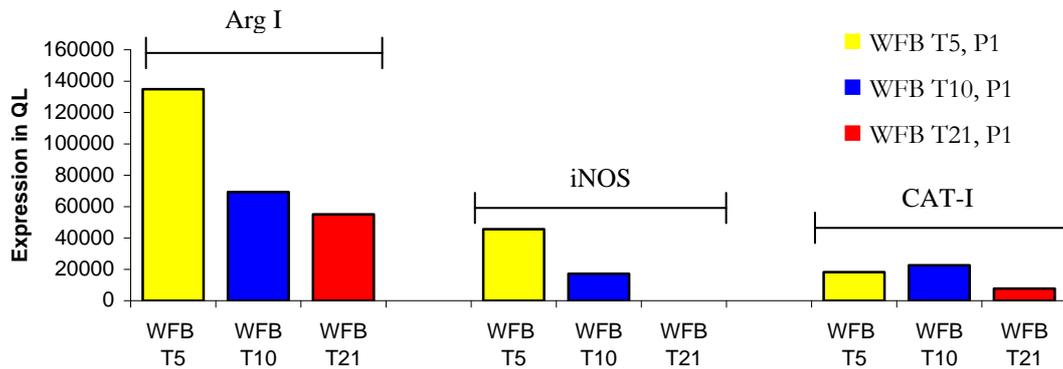


Abb. 4.2 zeigt die basale Expression der verschiedenen Enzyme und des CAT-I Transporters bezogen auf die erste Passage der WFB. Mit zunehmendem Alter der Wunden (also je später die WFB aus den Schwämmchen isoliert wurden) nimmt die Expression der Enzyme und auch des Transporters ab. Dies ist insbesondere an WFB der ersten Passage (P1) zu erkennen, da diese Zellen am kürzesten *in vitro* kultiviert wurden und damit nur wenige phänotypische Veränderungen durchgemacht haben.

4.3 Arg I Expression der WFB unter TGF- β_1 Stimulation

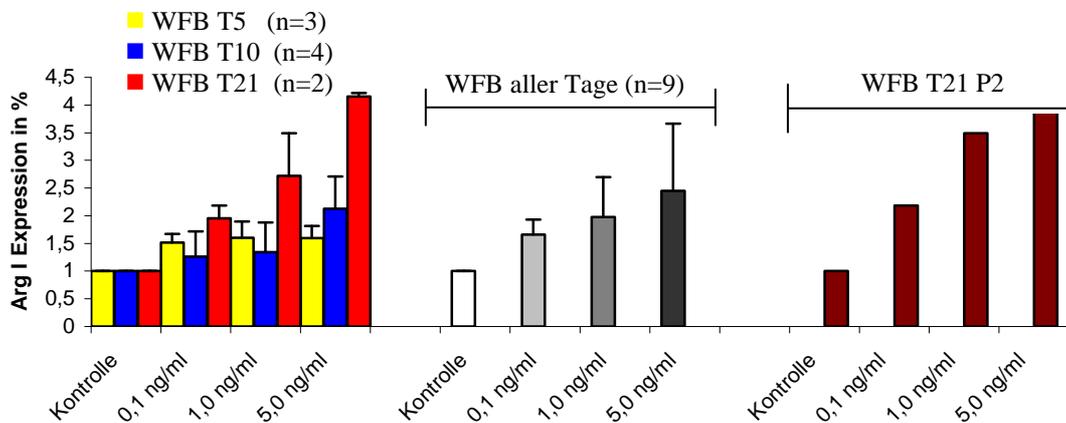
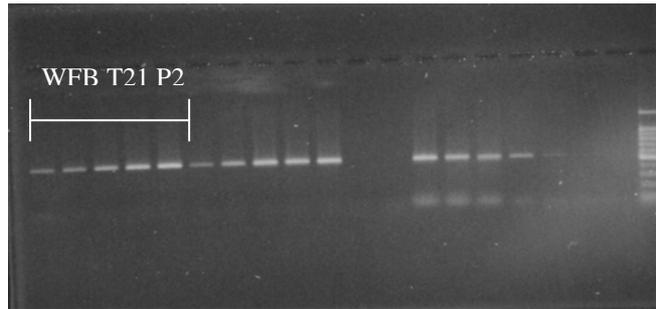


Abb. 4.3 zeigt links die Durchschnittswerte mit Standardabweichungen der Arg I Expression der WFB der unterschiedlichen Tage in Abhängigkeit von der TGF- β_1 Stimulation. Die Säulen in der Mitte zeigen die Mittelwerte der Arg I Expression aller WFB unter TGF- β_1 Stimulation. Rechts ist beispielhaft die Arg I Expression von WFB T21 mit dem dazugehörigen PCR Gel (unten) zu sehen. Die Daten zeigen eine deutliche

dosisabhängige Steigerung der Arg I Expression mit zunehmender TGF- β_1 Konzentration (0.1ng/ml, 1.0ng/ml, 5ng/ml). Ferner erkennt man deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Wundtagen.



So reagieren WFB von Tag 21 deutlich stärker auf den TGF- β_1 Stimulus als WFB der Wundtage 5 und 10.

4.4 Arg II Expression der WFB unter TGF- β_1 Stimulation

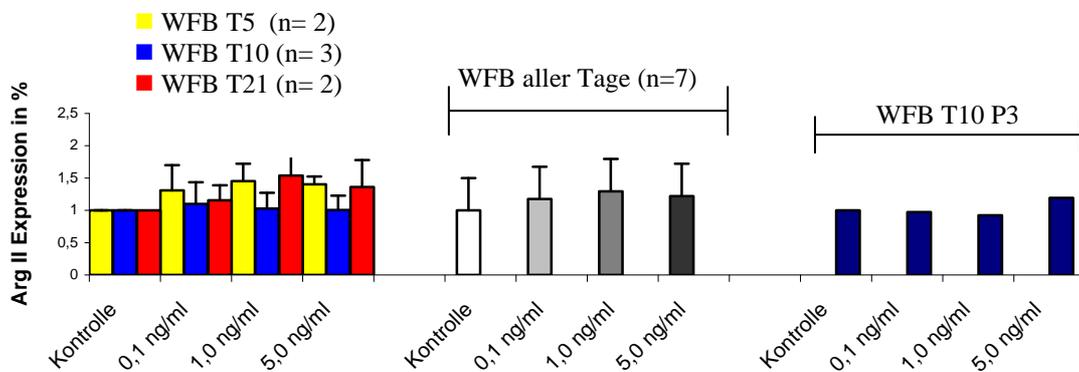
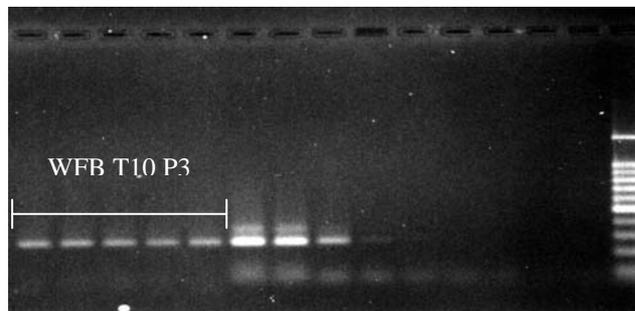


Abb. 4.4 zeigt zusammenfassend die Arg II Expression der verschiedenen WFB. Das linke Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Wundtage. In der Mitte sind die Mittelwerte aller WFB



und rechts die Einzelwerte von WFB T10 Passage 3 mit dem dazugehörigem PCR-Gel zu sehen. Es zeigt sich keine klare Tendenz der Ab- oder Zunahme der Arg II Expression durch TGF- β wie es bei Arg I gesehen wurde. Die Werte zeigten auch eine große Streuung um den Mittelwert, so daß die Ergebnisse als % Werte in Bezug auf die Kontrollen angegeben wurden. Auch konnten mehrere Versuche nicht zur Wertung herangezogen werden, da die Kontrollen an der Grenze des detektierbaren lagen und somit die abgeleiteten Werte großen Schwankungen unterlagen (s. Kommentar 4.6.1).

4.5 iNOS Expression der WFB unter TGF- β Stimulation

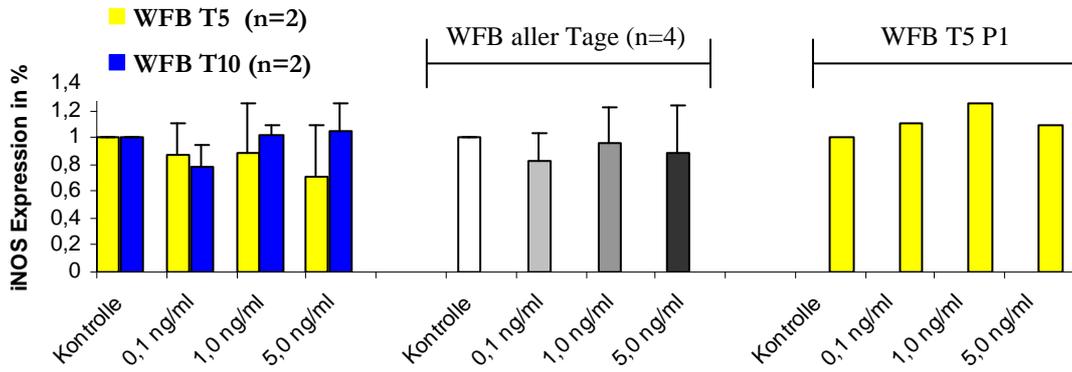
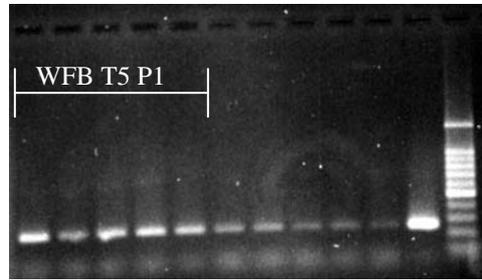


Abb. 4.5 faßt die Ergebnisse der iNOS Expression in WFB in Abhängigkeit von der TGF- β_1 Stimulation zusammen. Da WFB Tag 21 keine basale iNOS Expression aufwies, wurden diese nicht ausgewertet. Links sind die Mittelwerte der Wundtage 5 und 10 zu sehen. Betrachtet man die Mittelwert aller Wundtage, sind keine Veränderungen der iNOS Expression durch TGF- β zu vermerken. Rechts ist wiederum ein exemplarisches PCR Gel der iNOS Analyse zu sehen.



4.6 CAT-I Expression der WFB unter TGF- β_1 Stimulation

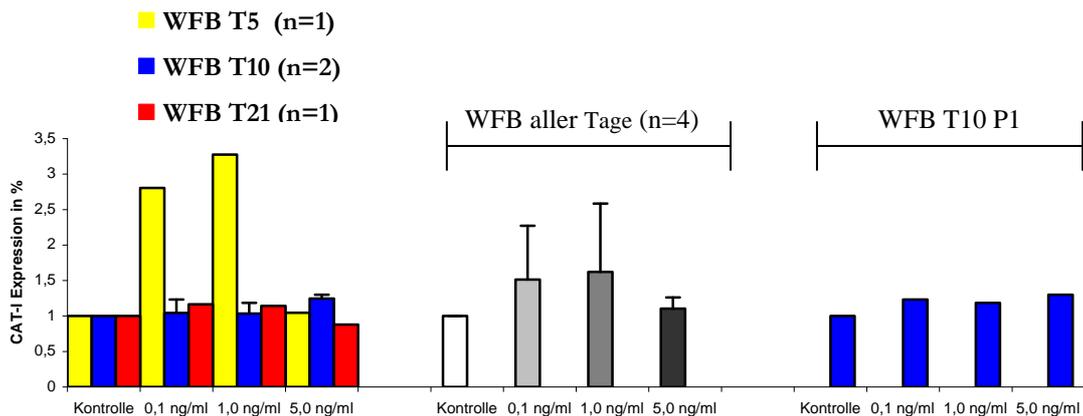
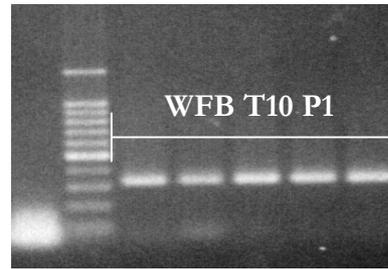


Abb. 4.6: Die Abbildung zeigt die Auswertungen der CAT-I Expression der WFB unter steigender TGF- β_1 Stimulation. WFB T5 müssen als Ausreißer gewertet werden, die das Gesamtergebnis (Mitte) erheblich beeinflussen. Werden diese Ausreißer nicht in die Mittelwertberechnung einbezogen, ergibt sich kein Einfluß von TGF- β auf die CAT Expression. Insgesamt konnten in diese Versuchsreihe viele Ergebnisse nicht in die Endwertung eingebracht werden, so daß auch die n-Zahl nur sehr klein ist und damit das Ergebnis nur eingeschränkt bewertet werden kann (Erklärung siehe 4.6.1)



4.6.1 Nicht gewertete Versuche der CAT-I Expression von WFB unter TGF- β_1 Stimulation

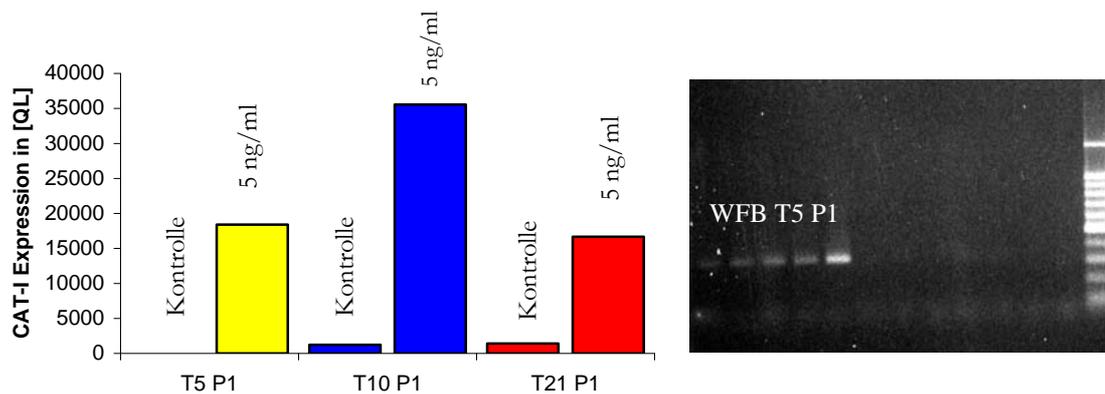


Abb. 4.6.1 Das Diagramm zeigt die Rohdaten einiger aus der Wertung genommenen Versuche. Die Lichtintensität der Banden im Gel wird in [QL] angegeben. Aus der Lichtintensität der Kontrollen wurde der Mittelwert in [QL] ermittelt. Dieser errechnete Zahlenwert wurde auf 100% gesetzt. Die gemessenen Werte der Proben wurden durch den Mittelwert der Kontrollen geteilt und man erhielt damit eine prozentuale Abweichung in Bezug auf den Mittelwert.

Um zu dieser Ergebnisdarstellung zu gelangen, waren zwingenderweise Werte von Kontrollen zur Auswertung notwendig. Im speziellen Fall der CAT Expression zeigten sich aber folgende Probleme:

- Bei einigen Versuchsreihen konnte keine Kontrolle detektiert werden, sehr deutlich aber die stimulierten Proben (s.o.)

- Lagen die Werte der Kontrollen an der Detektionsgrenze und die Werte der Proben dagegen deutlich darüber, so wurden die Werte der Proben ebenfalls nicht in die Berechnung aufgenommen, da die Ergebnisse in diesem Fall eine nicht reale Steigerung um mehrere 1000% zeigen.

Das PCR-Gel zeigt exemplarisch das Ergebnis von WFB T5 P1 (von links nach rechts: Kontrolle, Kontrolle + 0,1ng/ml TGF- β_1 , +1,0 ng/ml TGF- β_1 , +5,0 ng/ml TGF- β_1).

Insgesamt scheint TGF- β die CAT Expression zu steigern, allerdings sind die gewonnenen Daten hier nicht ausreichend auswertbar.

4.7 Einfluß von TGF- β_1 auf den zeitlichen Verlauf der Arg I, II und CAT Expression von WFB Tag 10

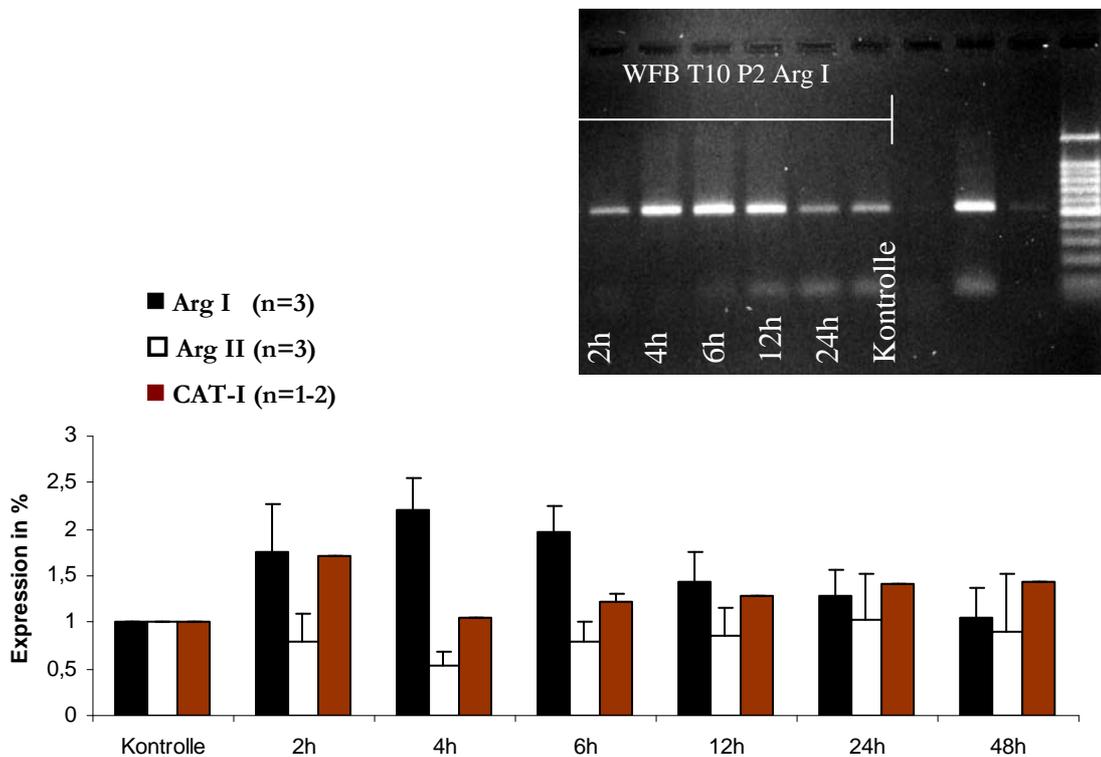


Abb. 4.7: Die Abb. zeigt die Expression von Arg I, Arg II und CAT in WFB T10 unter 5 ng/ml TGF- β_1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die RNA wurde nach den angegebenen Stunden (0, 2, 4, 6, 12 und 24) extrahiert und untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche, zeitabhängige Expressionszunahme von Arg I. Das Maximum ist nach 4-6 Stunden erreicht. Aufgrund dieser Zwischenergebnisse wurde in den

nachfolgenden Experimenten die ursprüngliche Stimulationszeit von 24h auf 6h reduziert. Die Arg II Expression nimmt 2h und 4h nach Stimulation geringfügig ab und bleibt dann aber relativ stabil. Die CAT-I Expression zeigt tendenziell eine mäßige Steigerung der Expression 2h nach Stimulation und bleibt dann ebenfalls stabil.

4.8 Arg-I Expression der WFB unter Interleukin-4 Stimulation

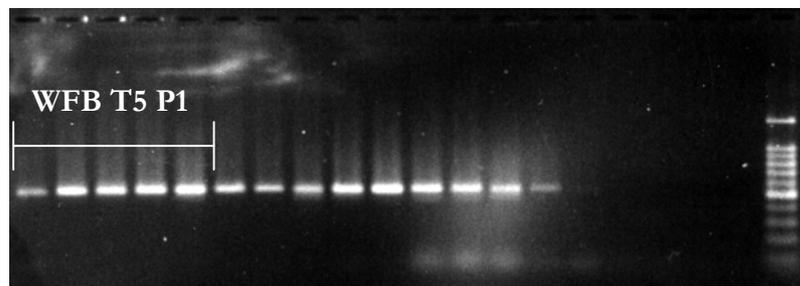
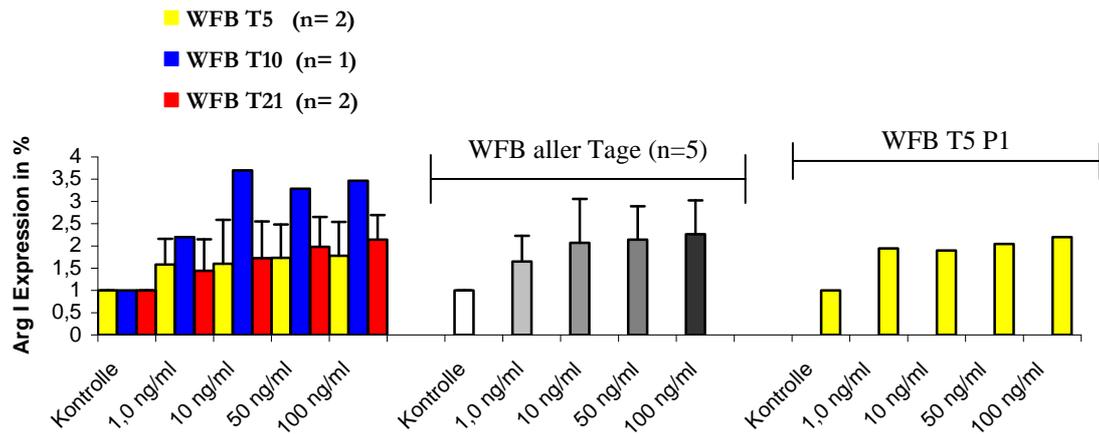


Abb. 4.8: Das Diagramm zeigt die dosisabhängige Expressionssteigerung von Arg I unter Interleukin-4 (IL-4). Links sind die einzelnen Mittelwerte (mit Standardabweichung) der verschiedenen Wundtage in Abhängigkeit von der IL-4 Konzentration dargestellt. In der Mitte sind die Mittelwert aller Untersuchungen zum Einfluß von IL-4 an WFB aufgezeigt und rechts ist exemplarisch ein Beispiel von WFB T5 P1 mit dem dazugehörigem PCR-Gel aufgeführt. Insgesamt ist ein deutlicher, dosisabhängig steigender Effekt von IL-4 auf die Arg I Expression zu sehen. Unter 100ng/ml IL-4 verdoppelt sich die Expression von Arg I.

4.9 Arg-II Expression der WFB unter IL-4 Stimulation

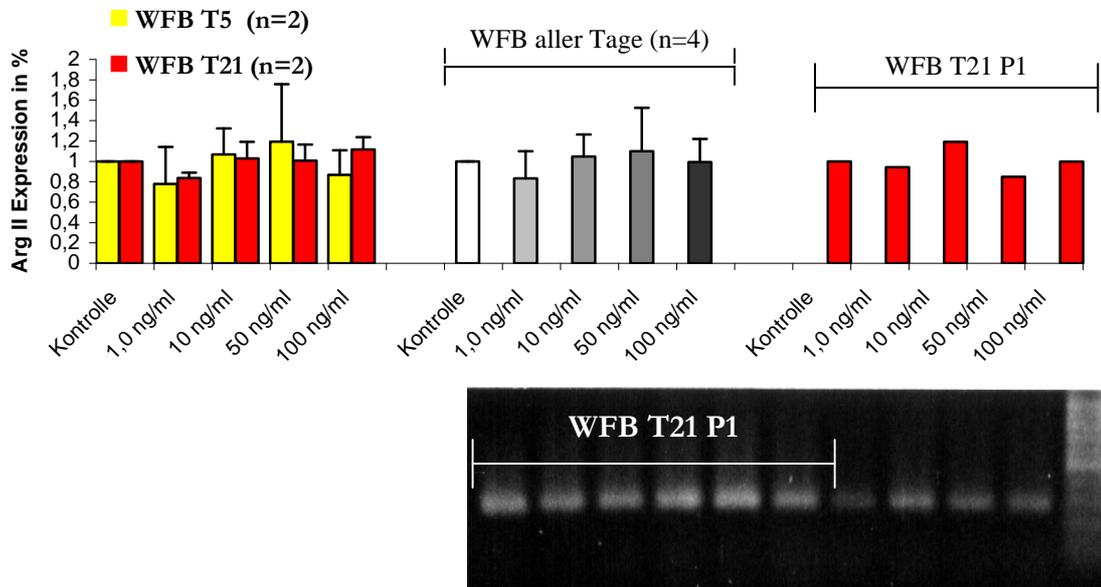


Abb. 4.9: Zusammenfassend sind die Ergebnisse zur Arg II Expression unter IL-4 Stimulation in WFB dargestellt. Es konnte kein Effekt von IL-4 auf die Arg II Expression nachgewiesen werden. Links sind die Mittelwerte der Wundtage 5 und 21 dargestellt, in der Mitte werden die Mittelwerte der gesamten Daten und rechts ein Einzelexperiment mit dem dazugehörigen PCR-Gel (unten) gezeigt.

4.10 iNOS Expression der WFB unter IL-4 Stimulation

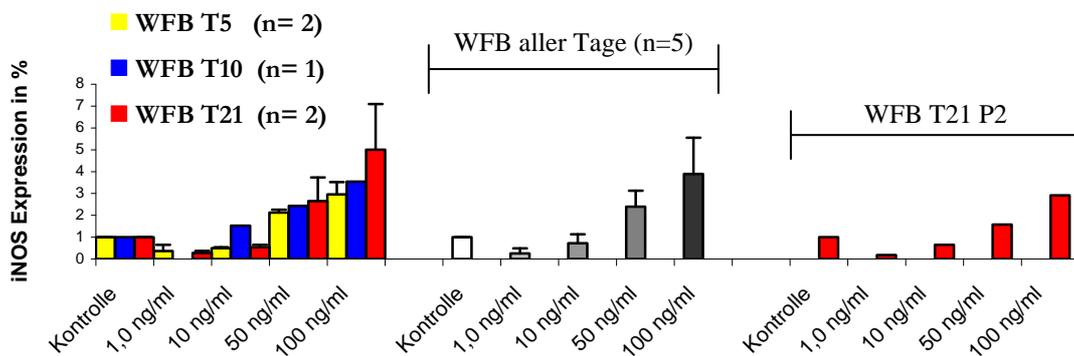
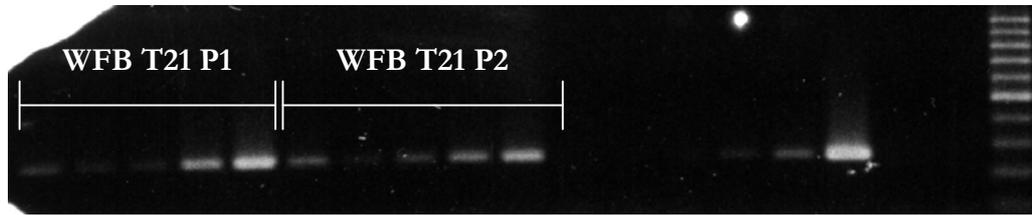


Abb. 4.10: Die Daten zeigen die IL-4 induzierten Expressionsänderungen von iNOS. In den Konzentrationen von 1-10 ng/ml IL-4 konnte eine Abnahme, bei höheren

Konzentrationen eine Zunahme der Expression erzielt werden. Links sind die Mittelwerte der Wundtage, in der Mitte werden die Mittelwerte der gesamten Daten und rechts ein



beispielhaftes Einzelexperiment mit dem dazugehörigen PCR-Gels (unten) gezeigt (1.0 ng/ml, 10.0ng/ml, 50 und 100 ng/ml).

4.11 CAT-I Expression der WFB unter IL-4 Stimulation

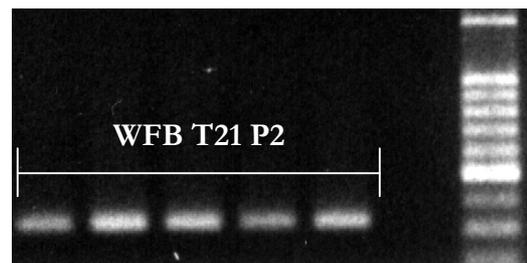
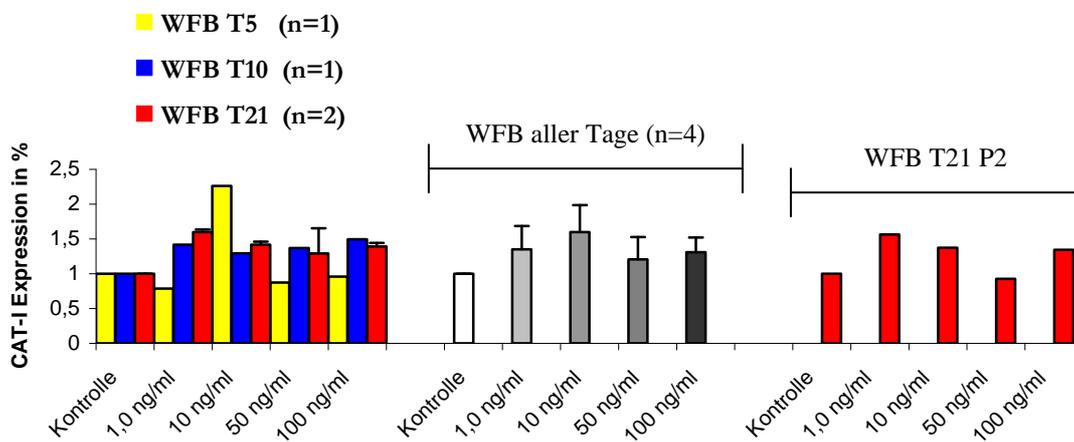


Abb. 4.11: Die Daten zeigen die CAT-I Expression unter steigender IL-4 Stimulation (1, 10, 50, 100 ng/ml IL-4). Links die verschiedenen Wundtage (Tag 5, 10 und 21), mittig die Mittelwerte aller Ergebnisse und rechts ein exemplarischer Versuch mit dem dazugehörigen PCR-Gel. Es zeigt sich eine Expressionssteigerung bei 1 und bei 10 ng/ml IL-4 im Vergleich zur Kontrolle.

4.12 Zeitlicher Verlauf der Expression von Arg I, II sowie iNOS und CAT in WFB unter Stimulation mit IL-4

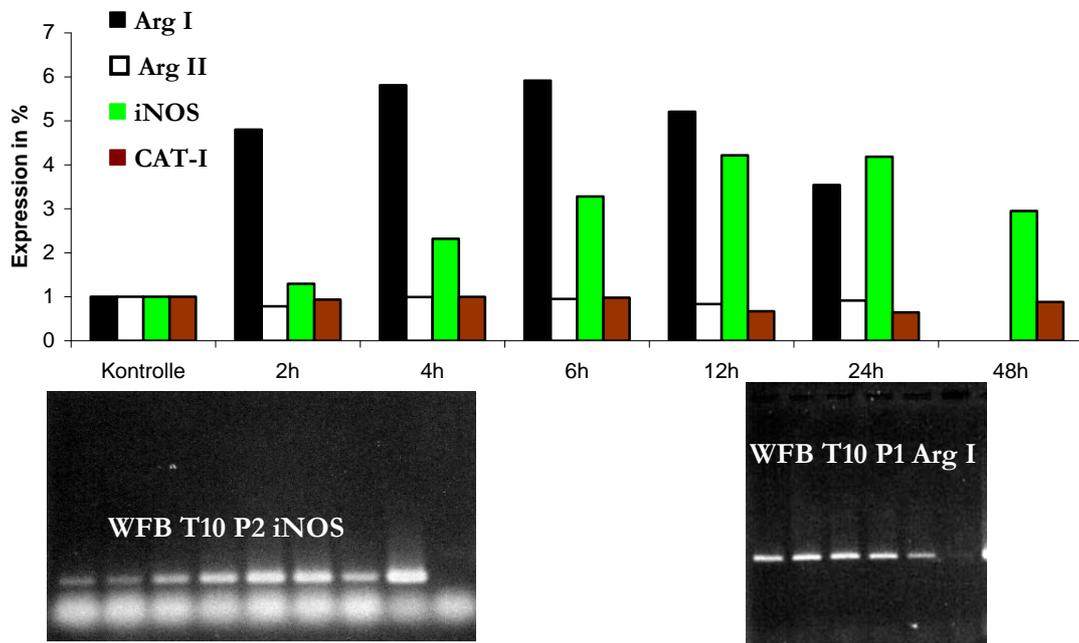
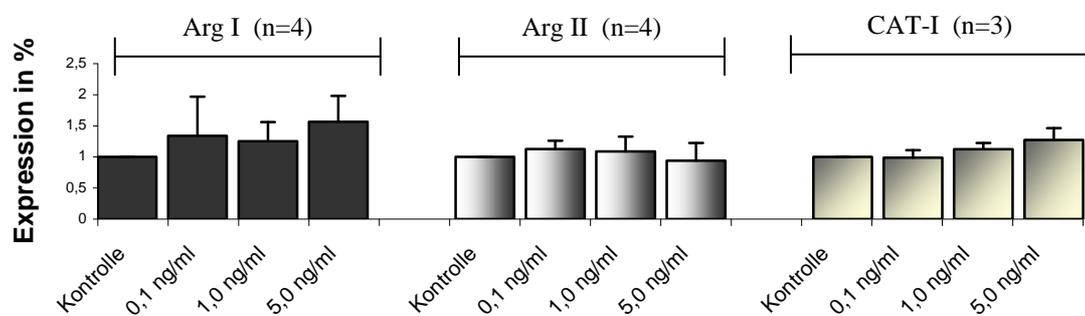


Abb. 4.12: Zeitliche Darstellung der Expressionsänderungen der verschiedenen Enzyme unter 50 ng/ml IL-4. Es zeigt sich eine deutliche Expressionssteigerung von Arg I mit einem Peak zwischen 4-6 h. iNOS dagegen zeigt das Maximum zwischen 12-24h, also wesentlich später, wenn die Arg I Expression bereits wieder nachläßt. Diese zeitlich klar distinkte Expression der beiden Arginin verstoffwechelnden Enzyme in der gleichen Zelle ist bisher so nicht für Fibroblasten beschrieben. Ob eine Form der Gegenregulation vorliegt, ist bisher noch rein spekulativ. Arg II und CAT zeigen - wie bereits in den Vorexperimenten dargelegt - keine Änderung der Expression unter IL-4.

4.13 Expression von Arg I, II und CAT-I in NFB unter Stimulation mit TGF- β_1



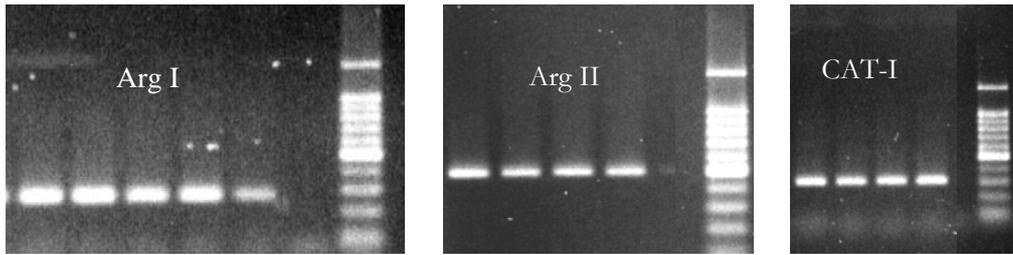


Abb. 4.13 zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung aller Versuchsreihen für NFB unter TGF- β_1 Stimulation (0.1, 1.0 und 10ng/ml TGF- β). Arg I zeigt eine Steigerung der Expression. Bei Arg II zeigt sich keine Änderung unter TGF- β . Die Tendenz bei CAT-I ist zu gering, um hier von einer Expressionssteigerung sprechen zu können. Die PCR-Gele zeigen exemplarisch Einzelversuche, die alle an NFB P2 durchgeführt wurden.

4.14 Expression von Arg I und II sowie CAT-I der NFB unter IL-4 Stimulation

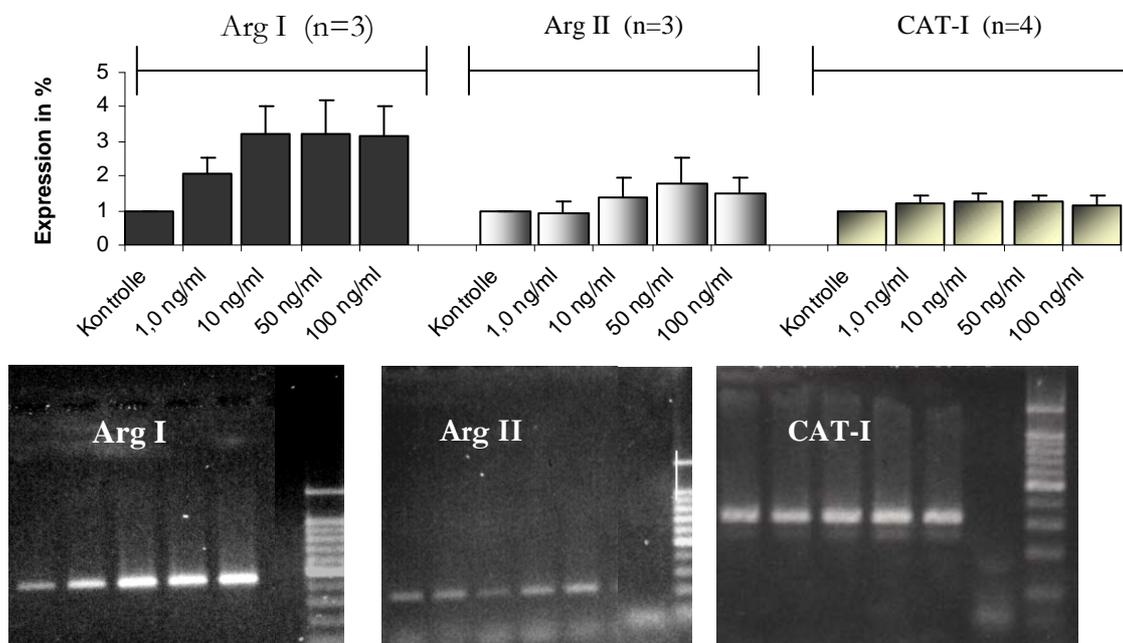


Abb. 4.14 zeigt die Mittelwerte aller Versuchsreihen für NFB unter Stimulation mit steigenden Konzentrationen IL-4 (1, 10, 50, 100ng/ml). Man sieht eine deutliche Steigerung für das Enzym Arg I. Arg II zeigte zu große Streuungen um den Mittelwert, als dass hier von einer gesicherten Steigerung für dieses Enzym unter IL-4 Induktion gesprochen werden kann. CAT-I zeigte keine Veränderungen. iNOS konnte auch in hohen Konzentrationen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Exemplarisch sind die dazugehörigen PCR-Gele dieser Versuchsreihen abgebildet. [NFB P 2 für Arg I und CAT, NFB P 1 für Arg II].

5 Diskussion

5.1 In vitro Modell und Fibroblasten Phänotyp

Gibt es bezogen auf die Enzyme Arginase I (AI) und Arginase II (AII) einen Unterschied zwischen normalen dermalen Fibroblasten (NFB) und Fibroblasten, die aus einer Wunde gewonnen wurden (Wundfibroblasten, WFB)? Und wie sind diese Enzyme durch die potenten profibrotischen Zytokine TGF- β_1 und IL-4 zu beeinflussen? Könnten dadurch diese Enzyme eine Rolle für die Wundheilung spielen? Wird die Expression der induzierbaren Isoform der NO Synthase (iNOS) durch die Modulation der Arginase beeinflusst?

Diese Fragen galt es im Rahmen dieser Arbeit zu klären. Als Untersuchungsmethode wurde die RT-PCR gewählt, da bisher noch nie eine Expression von AII auf Proteinebene in NFB oder WFB nachgewiesen wurde. Um also zuerst zu testen, ob überhaupt eine Expression vorliegt und wie diese dann ggf. verändert wird, wurde diese sensitive Methode gewählt.

Da es kein speziell entwickeltes in vivo Modell gibt, welches selektiv Fibroblasten untersuchen kann, wurden die Untersuchungen an einem in vitro Modell durchgeführt. Dies etablierte Wundmodell erlaubt es, die Fibroblasten aus der Wunde zu extrahieren und in vitro unter standardisierten Bedingungen weiter zu bearbeiten (41). Die weitaus meisten Fragestellungen wurden bisher anhand dieses Modells beantwortet und publiziert. Es ist davon auszugehen, daß die so gewonnenen WFB ihren Phänotyp über die ersten 3-4 Passagen in vitro behalten. Dabei umfaßt die Definition des Phänotyps alle möglichen zellulären, oberflächenspezifischen und synthetischen Charakteristika (z.B. Kollagensyntheserate oder Proliferationsrate).

Betrachtet man zum Beispiel die basale Expression des Enzyms Arg I, erkennt man deutlich den Einfluss der Passagierung der WFB. Im Gegensatz dazu zeigten die NFB keine Veränderungen in Abhängigkeit von der Passagierung. Daraus lässt sich ableiten, dass die gewonnenen WFB, bedingt durch das Wundmilieu und dessen Wachstumsfaktoren oder Zytokine, einer Aktivierung unterlegen haben müssen, bevor sie in der Zellkultur weiterverarbeitet worden sind. Für die Tatsache, daß das Wundmilieu einen Einfluß auf den WFB Phänotyp ausübt, spricht auch die Tatsache, daß iNOS in WFB aber nicht in NFB nachweisbar war. Je länger diese Zellen unter in vitro Bedingungen kultiviert und

damit passagiert werden, desto stärker verändert sich der ursprüngliche Phänotyp der WFB in Bezug auf Arg I und iNOS. Für diese Beobachtung gibt es viele Hypothesen:

Eine mögliche Begründung könnte darin liegen, dass während der *in vitro* Kultur die stimulierend wirkenden Zytokine des Wundmilieus fehlen (z.B. γ IFN). So konnten frühere Arbeiten zeigen, daß die Zugabe von Wundflüssigkeit den NFB hin zum WFB Phänotyp verändert (88).

Eine weitere mögliche Ursache könnte durch den nun fehlenden Synergismus der verschiedenen Wundzellen herrühren. Trautmann et al., 1998 (108) zeigte, dass es nur eine gesteigerte Proliferation der Fibroblasten durch IL-4 gab, wenn die Mastzellen die Möglichkeit des Zell-Zell-Kontaktes mit den Fibroblasten hatten oder eine zusätzliche Gabe von „basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)“ erfolgte.

Die dritte Möglichkeit besteht in der Veränderung der Rezeptoren der Zelloberfläche. Wie in der Einleitung schon beschrieben, ändert sich dies Muster im zeitlichen Verlauf der Wundheilung. Nun liegt es nahe, dass Fibroblasten, die in der Zellkultur auf einem Plastikuntergrund heranwachsen, sich auf der Ebene der Zelloberflächenmoleküle grundlegend verändern können. Es bleibt offen, in wie weit dies die Expression der intrazellulären Enzyme beeinflussen kann.

Welche Zellen aus dem Pool der existierenden Fibroblasten der Tiere haben überhaupt die Fähigkeit der Migration und Proliferation? Raghu et al, stellte 1988 die Hypothese auf, dass nur Stammzellen oder sehr „junge“ Fibroblasten bei einer Entzündung rekrutiert werden (86). Bayreuther et al. zeigte, dass die Fibroblasten eine 11-stufige Maturation in ihrem Leben durchlaufen – von der undifferenzierten Stammzelle (S1-S3), über die mitotisch aktiven Fibroblasten (MF I-III), über die postmitotischen Fibroblasten PMF IV-VI bis zum programmierten Zelltod Apoptose (PMF VIIa) (8, 9).

Es könnte durchaus sein, daß WFB im Verlauf der Wundheilung einen phänotypischen Wandlungsprozeß durchlaufen und daß dementsprechend der Zeitpunkt der Isolierung der Zellen aus den Schwämmchen einen bedeutenden Einfluß hat. Obwohl durch die Experimente nicht bewiesen, sind wir immer von einer heterogenen Zellpopulation der WFB ausgegangen. Auch ist es aufgrund unserer Ergebnisse zur Zeit nicht möglich zu sagen, ob nur eine bestimmte Subpopulation von WFB nach Stimulation die Expression von Arginase I und iNOS erhöhte oder ob für diesen Effekt alle kultivierten Zellen verantwortlich zu machen sind.

5.2 Basale Expression der Enzyme Arginase I, II , iNOS und CAT

Die basale Arg I Expression in WFB nimmt von Tag 5 bis Tag 21 und im Verlauf der Passagen von P1 bis P3 zu. Dagegen bleibt die Arg I Expression über die Passagen der NFB weitgehend konstant (Abb. 4.1 und 4.2). Ein quantitativer Unterschied hinsichtlich Arg I und II konnte zwischen NFB und WFB nicht sicher festgestellt werden. Vorangegangene Arbeiten aus unserem Labor zeigten hingegen, dass die Arginase Aktivität in WFB deutlich gegenüber den NFB erhöht war, sich aber über die Wundtage nicht veränderte (121). Dies könnte vermuten lassen, daß entweder eine verstärkte Transkription oder ein verminderte Degradation von Arg I vorliegt. Für iNOS ist bekannt, daß TGF- β 1 zu einer vermehrten Degradation der iNOS mRNA führt und dadurch die iNOS Expression abnimmt (114).

Die beiden Enzyme Arg I und II weisen eine hohe chemische Ähnlichkeiten auf - sie besitzen beide eine Michaelis-Konstante im millimolaren Bereich, beide benötigen Mg^{2+} und beide ähneln sich in ihrer Struktur (52). Die physiologische Funktion der in den Mitochondrien lokalisierten Arginase II in den Fibroblasten ist noch weitgehend unklar. Sie weist weder einen Unterschied in den verschiedenen Passagen (Daten nicht gezeigt) noch in den unterschiedlichen Wundtagen auf. Sowohl die unterschiedliche Genlokalisierung der beiden Arginase Enzyme als auch deren unterschiedlichen zellulären Lokalisation könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Regulation sein (40, 50, 113).

Dennoch ist es auffallend, dass die Arginase II Expression selbst in Stresssituationen der Zelle (Stimulation mit TGF- β , IL-4) bei WFB entweder nur geringfügig steigt (TGF- β ₁) oder keiner Veränderung unterliegt (IL-4). Auch in NFB konnte keine Veränderung durch die Stimulation gezeigt werden. Auch auf Protein Ebene mittels Western Blot konnte Arg II in WFB nicht nachgewiesen werden (121). Dies ist besonders bemerkenswert, da im Falle eines Gendefektes für Arginase I oder bei einer Hyperargininämie das Enzym Arg II induziert wird und somit einen alternativen Abbauweg für L-Arginin darstellt (42, 49).

Kämpfer et al. zeigte, dass sowohl die Arg II mRNA als auch das dazugehörige Protein in verwundeter Mäusehaut deutlich stärker nachweisbar war als in den Kontrollen mit einer starken Abnahme der Menge am Wundtag 13 (54). Dies läßt vermuten, dass die vermehrte Produktion von Arg II mRNA in Kämpfers Versuchen nicht aus den WFB oder NFB stammt.

iNOS konnte in unstimulierten NFB nicht nachgewiesen werden. In WFB dagegen ist

iNOS in den ersten beiden Passagen detektierbar. Am fünften Wundtag, also in der Phase der Inflammation, zeigten die WFB die stärkste basale Expression. Im Verlauf der Wundheilung nahm die iNOS Expression ab, d.h. daß WFB, die aus „älteren“ Wunde isoliert wurden, weniger iNOS exprimieren als WFB aus „jüngeren“ Wunden. Diese Ergebnisse aus unserem Labor korrelieren positiv mit den Untersuchungen von Most et al. (75). Die Tatsache, daß die NO Bildung mit zunehmender Passage abnimmt, konnte bereits durch Schäffer 1997 anhand der Messung von Nitrit - das messbare Abbauprodukt des NO - im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (96). Ab der vierten Passage gelang der Nachweis im Medium nicht mehr.

In unseren in vitro Versuchen konnten wir ferner zeigen, dass der WFB Phänotyp bezogen auf die basale Expression des CAT ebenfalls als nicht stabil zu betrachten ist. Bei den WFB ist die Tendenz der Zunahme der Expression im Verlaufe der Passagierung zu beobachten. Die Expression korreliert mit der basalen Expression der Arg I und verhält sich reziprok zu iNOS. Hat also ein Fibroblast in den Versuchen eine starke Expression für Arg I, so korreliert dies mit einer starken Expression des CAT-I und einer geringeren für iNOS. Dies erscheint insofern sinnvoll, als daß eine Steigerung der Arg I Expression nur Sinn macht, wenn auch das nötige Substrat vorhanden ist. Andererseits zeigen die Ergebnisse eine reziproke Hemmung zwischen iNOS und Arg I bzw. CAT. Dies ist erstaunlich, da iNOS ebenfalls das Substrat L-Arginin benötigt, um NO zu synthetisieren. Simmons hingegen belegte einen deutlichen Synergismus bei der Induktion von iNOS und CAT-I an Herzmuskelzellen, allerdings unter der Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen γ -INF und IL-1 β (105). Dieses Ergebnis wirft nun die Frage auf, woher iNOS sein Substrat bezieht. Nur aus der endogenen Reutilisation von Citrullin zu Arginin? Oder gibt es noch andere Transportwege für L-Arginin in den Fibroblasten von extra- nach intrazellulär?

Die Korrelation zwischen basaler Arg I und CAT Expression läßt vermuten, daß ein direkter Zusammenhang zwischen beiden bestehen muß. Mögliche Erklärungen hierfür könnten sein:

- Eine sinkenden Konzentration des zytosolischen L-Arginins durch den Abbau via Arg I induziert die Expression von CAT-I,
- Bei der Transkription/Translation der Arg I werden kostimulatorische Substanzen für

die CAT-I Expression produziert,

- Die Abbauprodukte des Arginins via Arg I erhöhen die Transkription von CAT-I.

Dabei stellt die erste Möglichkeit sicherlich eine sehr wahrscheinliche dar.

5.3 Expression der Enzyme unter TGF- β Stimulation

5.3.1 Arginase I Expression

In den durchgeführten Experimenten wurden die Fibroblasten mit max. 10 ng/ml TGF- β_1 stimuliert. Der biologische Effekt des Zytokins ist stark von der Konzentration abhängig. So zeigte Popik z.B. eine Steigerung der Zellproliferation bei 0,1 - 1,0 ng/ml aber eine Abnahme bei höheren Konzentrationen (85). Dagegen konnten Wrana und Fine keine Steigerung bei 0,1-1 ng/ml TGF- β feststellen (122). TGF- β ist laut Ibelgaufts (48) in Bereichen von 1-2 fg der stärkste bekannte Inhibitor der Fibroblasten Proliferation, bei höheren Konzentrationen steigert er aber die Vermehrung dieser Zellen. Die von uns gewählte Konzentration entspricht annähernd publizierten Konzentrationen in Wundflüssigkeiten und wurde deshalb so gewählt (Tab. 30).

Tab. 30: TGF- β Konzentrationen in verschiedenen Publikationen(46), (80), (109), (115)

Wundtag	TGF-β Konzentration	Ursprung	Lit.
1, 2 (Mamma Chirurgie)	15,6 \pm 8,6 ng/ml; 11,7 \pm 5,0 ng/ml	humane WF	(46)
bis 24 h (Brandwunde)	bis zu 13 ng/ml	Plasma Mäusen	(80)
Patienten mit schweren Verbrennungen	123,04 \pm 36,48 ng/ml	humanes Serum	(109)
gesunde Kontrollgruppe	56,85 \pm 8,38 ng/ml		
bis 10 (plastische Chirurgie)	40 \pm 10 pg/ml	humane WF	(115)

Die Stimulation mit TGF- β führte zu einem deutlichem, dosisabhängigen Anstieg der Arg I Expression in den WFB aller Tage (5, 7, 10, 21). Interessanterweise konnten wir in NFB nur in der ersten Passage der eine Expressionssteigerung durch TGF- β erzielen, die allerdings gegenüber den WFB nicht so stark war.

Der Unterschied zwischen WFB und NFB in Bezug auf die Arg I Expression durch Inkubation mit TGF- β scheint seine Ursache in der vorangegangenen Aktivierung der WFB durch die Wundsetzung zu haben. Evt. scheint hier das Wundmilieu einen sensibilisierenden Effekt auf die TGF- β Wirkung der WFB ausgeübt zu haben, denn eigentlich sind WFB selber in der Lage, TGF- β zu synthetisieren (48, 110, 116, 124). Auf

der anderen Seite hat die Zugabe von Wundflüssigkeit alleine (10% v/v) keinen stimulierenden Effekt auf die Arg I Expression (121).

Auch in Makrophagen und in glatten Muskelzellen der Gefäße konnte eine Steigerung der Arginase Aktivität durch TGF- β erreicht werden (13, 34).

5.3.2 Arginase II Expression nach Stimulation mit TGF- β_1

Interessanterweise zeigte sich bei dem im Mitochondrium lokalisierten Enzym Arg II keine deutliche Tendenz einer Änderung der Expression nach Inkubation mit TGF- β_1 . Bei den NFB war weder eine Zu- noch Abnahme zu sehen. Die Ergebnisse an den WFB aller Wundtage unterlagen zu große Schwankungen, so dass auch hier davon ausgegangen werden muss, dass TGF- β_1 in unserem Versuchsaufbau keinerlei Einfluss auf die Arg II Expression sowohl in WFB als auch bei den NFB hat. Bei vorangegangene Arbeiten aus unserem Labor konnte selbst unter Stimulation von TGF- β keine Arg II Aktivität in Fibroblasten detektiert werden (121). Die Rolle des Arg II in der Wundheilung bleibt somit weiterhin völlig unklar.

5.3.3 iNOS Expression

TGF- β_1 gilt in der Literatur als starker Inhibitor von iNOS (90). Die wird teilweise über die vermehrte Degradation von iNOS mRNA hervorgerufen. Unsere Ergebnisse dagegen konnten keinen suppressiven Effekt von TGF- β auf die iNOS Expression in WFB zeigen. An Synovialzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte Broderie diesen Effekt ebenfalls nachweisen (48). Da sowohl die Endprodukte des Abbaus des Arginins via Arg I als auch TGF- β_1 selbst die iNOS Aktivität supprimieren, ist nach unseren Ergebnissen davon auszugehen, dass TGF- β_1 in WFB zwar die iNOS Aktivität vermindert, aber keinen Einfluß auf die iNOS Expression nimmt. In der Diskussion bezüglich des inhibierenden Effektes von TGF- β auf die iNOS Expression ist zu bedenken, ob die Zellen endogen stimuliert sind, iNOS zu bilden (wie die WFB) oder ob dies durch eine unphysiologische Kombination von zugeführten Zytokinen induziert wurde.

5.3.4 CAT-I Expression

Durch die Induktion von Arg I und iNOS liegt ein erhöhter Metabolismus der Aminosäure L-Arginin in WFB im Vergleich zu NFB vor. Mit der Untersuchung der CAT-I Expression sollte geklärt werden, ob dieser vermehrte Metabolismus mit einer gleichzeitigen Steigerung

der Expression von CAT-I in WFB korreliert. Ferner sollte untersucht werden, ob die Induktion von Arg I mit einer vermehrten CAT-I Expression korreliert. In glatten Gefäßmuskelzellen konnte eine Steigerung der CAT-I und -II mRNA Expression durch TGF- β_1 nach 24h Inkubation induziert werden (34).

Die Interpretation unserer Ergebnisse in Bezug auf die CAT-I Expression unter TGF- β_1 Inkubation gestaltet sich diffizil. Folgende Gründe sind hierfür zu nennen:

1. Unter denjenigen Versuchsreihen, bei denen die Kontrollen deutlich überhalb der Detektionsgrenze für CAT-I lagen, zeigte sich nur eine mäßige Expressionssteigerung der mRNA bei 0,1-1,0 ng/ml TGF- β_1 über einen Stimulationszeitraum von 24 h.
2. Sehr deutliche Ergebnisse dagegen zeigen die Rohdaten (s. Abb. 4.6.1). Diese Werte zeigen eine deutliche Expressionssteigerung von CAT-I unter TGF- β_1 Inkubation bei mehreren WFB Versuchsreihen (Stimulationszeit 24h). Diese Ergebnisse konnten nicht in die obige Berechnung eingehen, da entweder die Kontrolle nicht zu detektieren war, oder nur knapp oberhalb der Detektionsgrenze lagen. Für die prozentuale Berechnung werden aber Daten der Kontrollen benötigt.
3. Erschwerend für die Interpretation der Daten kommt hinzu, dass wir nach den ersten Zwischenergebnissen die Inkubationszeit von 24 h auf 6 h verkürzten. Es ist möglich, dass die Fibroblasten erst zeitlich versetzt - nach Ausschöpfung der intrazellulären L-Arginin Vorräte - den erhöhten Bedarf durch Induktion des Transporters und damit der extrazellulären Quellen decken. Der maximale Zeitpunkt der CAT Expression könnte somit zeitlich versetzt und damit nicht optimal gemessen worden sein.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte zeigen unsere Ergebnisse jedoch deutlich, dass TGF- β_1 die Expression von CAT-I steigert. Da sich bei den NFB im Gegensatz zu den WFB keinerlei Veränderungen der Expression von CAT-I zeigt, unterstreichen diese Ergebnisse wiederum die unterschiedlichen Phänotypen der Fibroblasten.

5.4 Expression der Enzyme nach IL-4 Stimulation

5.4.1 Arginase I

Das Zytokin IL-4 wird im Gegensatz zu TGF- β nur in T-Helferzellen und von Mastzellen synthetisiert (47). Ein deutlicher Unterschied zu TGF- β zeigt sich auch im Nachweis von IL-4 im Plasma, Serum und in der Wundflüssigkeit. Es gelang weder Struzyna (Detektionsgrenze 2 pg/ml bei humanem Serum) noch Ford (Wundflüssigkeit aus subkutan implantierten Schwämmchen in Mäusen) IL-4 nachzuweisen (36, 106). Dagegen konnte DiPiro sowohl bei der Kontrollgruppe (gesunde Probanden) (Mittelwert 15,6 pg/ml; n=20) als auch bei schwer verletzten Patienten (bei Einlieferung in die Intensivstation: Mittelwert 23,8 pg/ml, auf der Station: Mittelwert 74,4 pg/ml; n= 100) IL-4 im Plasma detektieren (32). Der Nachweis der endogenen Expression von IL-4 in WFB mittels PCR gelang auch in unserem Labor nicht (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation der Fibroblasten erfolgte über 6h mit einer Konzentration von 1-100 ng/ml IL-4, was sowohl bei NFB als auch bei WFB eine deutliche Steigerung der Arg I Expression in allen Passagen bewirkte.

Sempowski et al. zeigte 1994 an Lungenfibroblasten der Maus, dass IL-4 die Proliferation dieser Zellen erhöht (101). Trautmann bestätigte diesen proliferationsfördernden Effekt an Fibroblasten und zeigte zusätzlich, daß die Kollagensynthese in diesen Zellen durch IL-4 gesteigert ist (108). Sempowski zeigte in seiner Arbeit, dass aus dem Fibroblastenpool nur die Thy-1⁺ positiven Zellen nach der Inkubation mit IL-4 ihre Kollagensynthese steigern (102). Büttner konnte 1997 einen Zusammenhang zwischen erhöhten IL-4 Werten in der bronchoalveolärer Lavage von bestrahlten Ratten und der dadurch induzierten Lungenfibrose herstellen (17). Im Laufe der letzten Jahre verdichteten sich die Hinweise, dass IL-4 nicht nur in der Modulation des Immunsystems eingreift, sondern auch die extrazelluläre Matrix beeinflusst. Oriente et al. veröffentlichte 2000 Ergebnisse, wonach IL-4 die Kollagenproduktion in Fibroblasten ähnlich stark erhöht wie IL-13 und TGF- β_1 (81). Salmon-Ehr zeigte im gleichen Jahr den Benefit von IL-4 in der Wundheilung durch verbesserte Struktur des Granulationsgewebes, durch eine Erhöhung der Zellzahl und eine Intensivierung der inflammatorische Reaktion im Wundgebiet (94). Die Zeit bis zum kompletten Wundschluss verkürzte sich und die Kollagenkonzentration stieg im Wundgebiet der IL-4 behandelten Maus im Gegensatz zu den Kontrolltieren an.

Unsere Daten sind die ersten, die zeigen, dass IL-4 direkt in den Arginin-Stoffwechsel auf der Stufe der Arginase sowohl durch eine Erhöhung der Expression als auch der Aktivität in NFB als auch in WFB eingreift (121). Unsere Ergebnisse legen demnach nahe, dass IL-4 ein wichtiger Faktor für die Modulation der extrazellulären Matrix und somit ein wichtiger Bestandteil einer effizienten Wundheilung ist.

5.4.2 Arginase II

Wie auch bei den Versuchsreihen mit dem Zytokin TGF- β_1 , zeigt sich keine Tendenz dahingehend, dass IL-4 Einfluss auf die Arg II Expression in den Fibroblasten hat. Allerdings unterlagen den Daten zu große Schwankungen, um eine eindeutig eine Tendenz erkennen zu lassen. Somit bleibt auch nach diesen Versuchen die Funktion und Rolle der Arg II in den Fibroblasten bezogen auf die Wundheilung unklar.

5.4.3 iNOS Expression

Die Arbeitshypothese für diese Versuchsreihe bestand darin, dass eine Abnahme der Expression für iNOS unter IL-4 Inkubation erfolgen würde. Aus der Literatur ist bekannt, daß IL-4 in Makrophagen die iNOS Expression durch eine Hochregulierung des Arginase-Stoffwechselkreislaufs hemmt (76). Auch zeigten weitere Arbeiten, dass eine durch γ -IFN induzierte iNOS Expressionssteigerung durch die Applikation von IL-4 in Makrophagen gehemmt werden kann (11, 12, 24, 83, 95). Des weiteren zeigte sich in IL-4 KO Mäusen im Gegensatz zur wild type Population nach einer parasitären Infektion ein pathologisch hoher Gehalt an NO-Metaboliten, was wiederum den suppressiven Charakter von IL-4 auf iNOS unterstreicht (92).

Im Gegensatz dazu zeigte Guo, dass IL-4 die durch γ -IFN induzierte iNOS Expression potenzieren kann, die alleinige Gabe von IL-4 zu den humanen Epithelzellen der Atemwege aber keine detektierbaren Mengen der iNOS RNA erbrachte (44).

In unseren Versuchen führte die alleinige Gabe von IL-4 nicht zu einer iNOS Expression in NFB. Deswegen sind die Ergebnisse in WFB um so bemerkenswerter, die bei allen Wundtagen und bei höheren Konzentrationen von IL-4 (50-100 ng/ml) sowohl eine deutliche Expressionssteigerung für Arg I als auch für iNOS zeigen. Eine solche Koinduktion der beiden Gegenspieler des Substrats L-Arginin - iNOS und Arginase - ließ sich ebenfalls in aktivierten Makrophagen aber nach Stimulation mit LPS erreichen (73).

Dagegen supprimieren geringe Dosen (1-10 ng/ml) deutlich die iNOS mRNA bei gleichzeitiger Steigerung von Arg I. Genau der Effekt, den Sempowski entdeckte (nur Thy-1⁺ WFB produzierten Kollagen), könnte die Ursache für diese Koinduktion von iNOS und Arg I durch IL-4 in unseren Ergebnissen sein. Da wir nicht den Ursprung der RNA bestimmen können und dadurch nur die Möglichkeit haben, den gesamten Genpool aller verwendeten WFB in einem Versuch zu beurteilen (102), könnte es sein, dass eine Subpopulation der WFB aus dem Pool die NO Synthese übernimmt und eine andere die Ornithin Synthese via Arg I und beide Zelltypen unterschiedlichen Regulatormechanismen unterliegt.

Interessant ist auch der zeitliche Verlauf. So ist die höchste Konzentration bei der Arg I RNA nach 4 - 6 h erreicht. Die Expression von iNOS dagegen erreicht ihr Maximum erst nach 12-24 h. Entweder ist der IL-4 Effekt auf iNOS indirekt, was die zeitliche Verzögerung erklären könnte, oder Arg I reguliert die NO Synthese bei 50 ng/ml in der Anfangsphase genau wie in den Makrophagen von Munder durch Substratdepletion. Ferner ist bekannt, dass die Polyamine, Endprodukte des Abbaus von L-Arginin über Arg I und ODC, eine inhibitorische Wirkung auf iNOS besitzen (74).

Verschiedene Gene, die die inflammatorische und proliferative Antwort der Zelle kodieren, werden auf der transkriptionalen Ebene durch den nuclear factor- κ B (NF- κ B) reguliert (5). Es gibt mehrere Arbeiten die eine gegensätzliche Regulation der iNOS Expression durch NF- κ B zeigen. Most (75) zeigte in seiner Arbeit, dass NF- κ B die Expression des iNOS Gens hochreguliert und das Endprodukt NO einen negativen Feedback durch die Nitrosylierung des NF- κ Bs besitzt und dadurch den stimulierende Effekt auf die Transkription des iNOS Gens verhindert. Allerdings wird dieser Regelkreis kontrovers diskutiert: NO wird durch NF- κ B supprimiert (28, 75, 127), induziert (58) oder je nach Dosis hoch- oder herunterreguliert (25). Wie dem auch sei, die IL-4 Transduktion, die über das „signal transducer and activator of transcription 6“ (STAT 6) läuft, kann durch dieses Molekül NF- κ B blocken (118) und somit möglicherweise eine Senkung der Transkription des iNOS Gens hervorrufen. Nelson (79) fand, dass auch NF- κ B die STAT 6 Kaskade blockieren kann. Durch diese Erkenntnis lässt sich eine neue Arbeitshypothese formulieren: Geringe Mengen von IL-4 (1-10 ng/ml) blockieren NF- κ B und dadurch bedingt senken sie die Transkription des iNOS Enzyms - iNOS RNA in den WFB sinkt

dabei. Durch die hemmende Wirkung des NF- κ Bs wird aber auch die weiterführende Kaskade des STAT 6 blockiert - beide Regelkreise heben sich in ihrer Wirkung auf. Durch höhere Konzentrationen von IL-4 (50-100ng) und bedingt durch die Autoregulation des IL-4-Rezeptors übersteigt die STAT 6 Konzentration die der inhibierenden Wirkung des NF- κ B und reguliert sogar auf der Ebene der Transkription das iNOS-Enzym nach oben (s. Abb. 116). Auch hier ist noch mehr Forschungsarbeit nötig, um diese Frage zu klären.

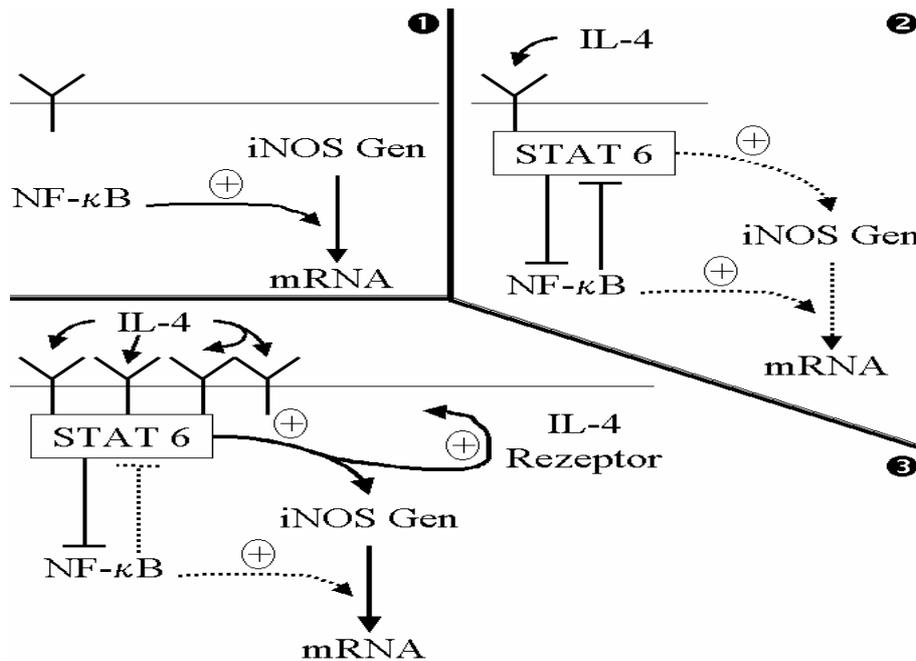


Abb. 5.1: Hypothese der Regulation des iNOS Gens durch IL-4 **1** Wirkungsweise des NF- κ B bei der Kontrollgruppe der WFB, **2** Zeigt den hypothetischen Regelkreis bei 1-10 ng/ml IL-4 – iNOS mRNA sinkt, **3** zeigt den Kreislauf bei 50-100 ng/ ml IL-4 (STAT 6 =signal transducer and activator of transcription 6, NF- κ B= Nuclear factor- kappaB)

5.4.4 CAT-I Expression

In unserem Versuchsaufbau hat IL-4 keinen Effekt auf die Expression des CAT-1, weder in NFB noch in WFB. Auch im zeitlichen Verlauf ist keine klare Tendenz zu beobachten.

Da wir nur die transkriptionelle Ebene untersucht haben, wäre es durchaus denkbar, dass sich IL-4 direkt oder indirekt an der Regulation des Influxes des L- Arginines in die Zelle beteiligt.

Louis et al. 1999 zeigte, dass Makrophagen nach Inkubation mit IL-4 sowohl die Arg I als auch die Expression des Transporters CAT-2B hochregulieren (65). Interessanterweise steigt die RNA Konzentration für diesen Transporter sehr schnell an (Intensität bei 4 h > 18 h). Es ist beschrieben, dass die Wirkung des IL-4 ohne Zugabe des fetalen Kälber-

serums (das unter anderem Wachstumsfaktoren enthält) nicht zu erlangen ist. Dies ist die einzige Arbeit, die einen Zusammenhang zwischen IL-4 und der Familie der CATs zeigen konnte.

Simmons et al. konnte einen Zusammenhang an Herzmuskelzellen bei der NO Produktion durch die L-Arginin Aufnahme durch den CAT-I belegen (105). In seinem Experiment stimulierte er die Zellen mit einem Mix aus IL-1 β und γ -IFN (bekannt als starke Stimulatoren für iNOS) und zeigte eine 10fache Erhöhung der mRNA für CAT-I. Nelin konnte ebenfalls einen Synergismus mit erhöhter NO-Produktion und erhöhter mRNA für CAT-I, II und einer erhöhten Argininaufnahme herstellen (78). In aktivierten Monozyten wird ebenfalls ein Synergismus zwischen NO- Produktion in diesem Falle mit CAT-2B vermutet (87).

In Stimulationsversuchen von WFB mit einem Gemisch aus LPS und γ IFN, war ein Anstieg der Expression des CAT-I sichtbar. Die Anzahl der Versuche (n=1) war gering, so dass sich leider aus diesen Beobachtungen nur vermuten lässt, dass die WFB, nach Inkubation mit starken Stimulatoren für iNOS wahrscheinlich mit einer erhöhten Transkriptionrate für CAT-I reagieren.

5.5 Physiologische Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse

Arginase I und II sind auf unterschiedlichen Genen kodiert und in den Geweben genuin differenziert lokalisiert. AI ist ein zytosolisches und AII ein mitochondriales Enzym. Da die weiteren Enzyme des Arginin-Stoffwechsels in der Zelle ebenfalls unterschiedlich lokalisiert sind (siehe Abb.: 3), könnte vermutet werden, daß AI mehr der Bildung von Polyaminen dient und AII für die Bildung von L-Prolin verantwortlich ist.

Ob die beiden Arginase Isoformen unterschiedliche Funktionen haben ist noch nicht abschließend geklärt. Beide Isoformen scheinen mit der Zellproliferation von Endothelzellen zu korrelieren, da eine Überexpression von AI oder AII zu einer vermehrten, Polyamin-vermittelten, Zellproliferation in diesen Zellen führt. Ferner vermitteln Arginase I und II einen Schutz vor der Apoptose in Maus Makrophagen (RAW Zellen) durch Depletion des Substrates Arginin. Eine Arbeit von Yu et al. in Mäusen zeigte AI mittels In situ Hybridisierung in den Haarfollikeln der Haut ohne Co-Lokalisation von OAT, ODC und AII. AI ist jedoch in anderen Geweben mit ODC Co-lokalisiert, was die Autoren vermuten läßt, daß AI dazu dient, bestimmte Gewebe mit Polyaminen zu

versorgen.

In anderen Entzündungsmodellen wie z.B. der Glomerulonephritis ist ebenfalls nur AI hochreguliert, während AII konstitutiv exprimiert bleibt. Anders dagegen bei der rheumatoiden Arthritis, wo nur die AII Isoform in der Synovialflüssigkeit durch Makrophagen und Fibroblasten hochreguliert ist. Hingegen kommt es bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose im Mausmodell zu einer Induktion beider Arginase Isoformen, wobei AI v.a. von Makrophagen und AII von Myofibroblasten (alpha-smooth muscle actin exprimierende Fibroblasten) sowie Makrophagen gebildet wird (35). Somit konnte zwar in den letzten Jahren eindeutig gezeigt werden, daß AI nicht nur in der Leber und AII in verschiedenen extrahepatischen Gewebe vorhanden ist, jedoch ist bisher ungeklärt, ob die beiden Isoformen spezifische Funktionen haben.

AI knock-out Mäuse zeigen einen vierfach höheren Arginin Plasmaspiegel mit einem deutlich reduzierten Prolin-Spiegel (19). AII knock-out Mäuse haben doppelt so hohe Arginin Plasmaspiegel im Vergleich zu den Wildtypen während die Polyamin - und Prolin Konzentrationen in unterschiedlichen Geweben oder in Fibroblasten-Kulturen aus AII Knock-out Mäusen nicht unterschiedlich waren (103).

Die Transfektion von AI und AII in Endothelzellen hingegen führt zu einer Veränderung des Arginin-Stoffwechsels in diesen Zellen (63). Auffallend ist, daß die Transfektion von AI und AII zu einer signifikanten Steigerung nicht nur der Arginase-Aktivität selber sondern auch des Arginin-Stoffwechsels hin zu Prolin und Glutamat [OAT] und Polyaminen [Putrescin und Spermin] führt. Synchron kommt es zu einer Abnahme der spontanen NOS-Aktivität. Anhand eines Exzisionsmodell an Mäusen wurde in einer Arbeit von Kampfer et al. von 2003 eine ähnliche zeitliche Expression der Arginase I und II mit einem raschen Anstieg und vermehrter Expression bis Tag 14 gefunden (57). In dieser Arbeit jedoch wurde AI v.a. in der Keratinozyten entlang des Wundrandes gefunden während Wundmakrophagen und Fibroblasten keine Arginase exprimierten. Dies läßt vermuten, daß die Arginase keinen Einfluß auf die Matrixsynthese hat sondern eher auf den Wundverschluß.

Zusammenfassend lassen die bisherigen Ergebnisse durchaus vermuten, daß die Regulation der Arginin verstoffwechselnden Enzyme Arg I , Arg II und iNOS eine wichtige Rolle im Rahmen der Wundheilung spielt, die es jedoch noch näher abzuklären gilt.

6 Zusammenfassung

Fibroblasten sind die wichtigsten Zellen für einen adäquaten Wundverschluss. Für diese Aufgabe wird der Argininstoffwechsel dieser Zellen benötigt. Dabei wird L-Arginin in der Zelle via Arg I und II in Prolin (Grundbaustein für das Kollagen) und das Polyamin Spermidin (wichtige Substanz für die Zellproliferation) umgewandelt. Gegenspieler dieses Stoffwechselweges ist das NO, welches über iNOS ebenfalls aus L-Arginin synthetisiert wird. Der Transport des L-Arginins von extra- nach intrazellulär wird über den Arginin Transporter CAT-I durchgeführt (s. Abb. 3).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expressionen der Enzyme bzw. des CAT-Transporters innerhalb dieses Stoffwechsels der Fibroblasten zu untersuchen. Es wurde dabei - bedingt durch das Wundmilieu - die phänotypische Umwandlung der NFB in WFB nachgewiesen.

Es wurde ferner gezeigt, dass sich WFB von NFB sowohl in der basalen Expression der für die Utilisation von L-Arginin wichtigen Enzymen, als auch in ihrer Regulation im Rahmen der Passagierung unterscheiden. Weiterhin wurde dargestellt, dass sich der Phänotyp der WFB sowohl in Bezug auf den Zeitpunkt der Gewinnung aus der experimentellen Wunde als auch in Bezug auf die *in vitro* Kultur sehr variabel verhält. Die Stimulierung durch verschiedene Zytokine wie TGF- β oder IL-4 führt bei WFB und NFB zu sehr distinkten Antworten in Bezug auf die Enzyme des Arginin-Stoffwechsels.

Im Hinblick auf die Frage nach der Funktion der Arg II in den Fibroblasten besteht auch nach dem Abschluss dieser Arbeit weiterhin noch Unklarheit. In den untersuchten Fibroblasten konnte das Enzym Arg II zwar konstant nachgewiesen werden, eine Änderungen im Expressionsverhalten konnte dabei weder über die Wundtage und den Passagen noch unter starken profibrotischen Stimulantien aufgezeigt werden.

In WFB konnte ein Anstieg in der Expression der Arg I im Verlauf der Passagierung gezeigt werden, welche bei den NFB ausblieb. Auch nach der Applikation von TGF- β_1 konnte eine Zunahme der Expression von Arg I nachgewiesen werden. Das Maximum wurde 4 h nach dem entsprechenden Stimulus gemessen. In NFB war ebenfalls eine Steigerung der Expression von Arg I nach Gabe von TGF- β_1 festzustellen, wenn auch in

einem deutlich geringerem Ausmaß. Nach der Stimulation mit IL-4 zeigte sich sowohl bei den NFB als auch bei den WFB eine deutlich Zunahme der Arg I Expression. Die Steigerung erreichte nach IL-4 Applikation das Maximum nach der 4.-6. Stunde. Weiterhin zeigte sich ein Abnahme der Expression für Arg I im Verlauf der Wundtage, d.h. eine niedrigere Expression am Wundtag 21 als am Wundtag 5.

Bezüglich des Enzyms iNOS konnte zu keinem Zeitpunkt der Versuche in NFB eine Expression nachgewiesen werden. In WFB dagegen konnte iNOS detektiert werden, es zeigte sich sowohl im Verlauf der Wundtage als auch im Verlauf der Passagen eine abnehmende Expression des Enzyms.

Mit der Zugabe von TGF- β_1 konnte in unserem Versuchsaufbau kein Effekt auf die iNOS Expression nachgewiesen werden. Mit dem Zytokin IL-4 konnte dagegen schon ab einer niedrigen Dosierung (1-10 ng/ml) eine Suppression der iNOS Expression erreicht werden. Eine hohe Dosis IL-4 (50-100ng/ml) dagegen steigerte die Stimulation der iNOS Expression in WFB.

Der Transporter CAT-I war in jedem untersuchtem Zelltyp nachweisbar. Unsere im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten geben Hinweise, dass die Zugabe von TGF- β_1 die Expression von CAT-I in WFB steigern könnte.

Wundheilungsstörungen und ihre adäquate Versorgung stellen auch weiterhin eine hohe Herausforderung im klinischen Alltag dar. Die aus dieser Arbeit gewonnenen Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass die in Fibroblasten enthaltenen Enzyme Arg I, Arg II und iNOS vermutlich eine wichtige, wenn nicht eine zentrale Rolle im Laufe der Wundheilung darstellen. Die Frage, ob durch Eingriffe in die Regulation des Arginin-Stoffwechselweges die dabei vorkommenden Störungen eventuell positiv zu beeinflussen sind, wird durch weitere Untersuchungen zu klären sein.

7 Literaturverzeichnis

1. 2002. Nitric Oxide and Wound Healing-is it really necessary ?, 2002 Joint Conference of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society, Plenary Speakers ed. Witte, MB, Baltimore.
2. **Alberts B, B. D., Lewis J et al.** 1994. Cell in their social context: Cell junctions, cell adhesion, and extracellular matrix, 3. ed, New York, Garland Publishing.
3. **Albina, J. E., C. D. Mills, A. Barbul, C. E. Thirkill, W. L. Henry, Jr., B. Mastrofrancesco, and M. D. Caldwell.** 1988. Arginine metabolism in wounds. *Am J Physiol* **254**:E459-67.
4. **Albina, J. E., C. D. Mills, W. L. Henry, Jr., and M. D. Caldwell.** 1990. Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* **144**:3877-80.
5. **Baeuerle PA, H. T.** 1994. The inducible transcription activator NF-kB : regulation by distinct protein subunits. *Biochem Biophys Acta* **1072**:63-80.
6. **Bailey, A. J., T. J. Sims, L. Le, and S. bazin.** 1975. Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **66**:1160-5.
7. **Barbul, A., R. S. Fishel, S. Shimazu, H. L. Wasserkrug, N. N. Yoshimura, R. C. Tao, and G. Efron.** 1985. Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. *J Surg Res* **38**:328-34.
8. **Bayreuther, K., P. I. Francz, J. Gogol, C. Hapke, M. Maier, and H. G. Meinrath.** 1991. Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems. *Mutat Res* **256**:233-42.
9. **Bayreuther, K., H. P. Rodemann, R. Hommel, K. Dittmann, M. Albiez, and P. I. Francz.** 1988. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5112-6.
10. **Benn, S. I., J. S. Whitsitt, K. N. Broadley, L. B. Nanney, D. Perkins, L. He, M. Patel, J. R. Morgan, W. F. Swain, and J. M. Davidson.** 1996. Particle-mediated gene transfer with transforming growth factor-beta1 cDNAs enhances wound repair in rat skin. *J Clin Invest* **98**:2894-902.
11. **Berkman, N., A. Robichaud, R. A. Robbins, G. Roesems, E. B. Haddad, P. J. Barnes, and K. F. Chung.** 1996. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin- 4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. *Immunology* **89**:363-7.
12. **Bogdan, C., Y. Vodovotz, J. Paik, Q. W. Xie, and C. Nathan.** 1994. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* **55**:227-33.
13. **Boutard, V., R. Havouis, B. Fouqueray, C. Philippe, J. P. Moulinoux, and L. Baud.** 1995. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* **155**:2077-84.
14. **Brody, J. S., Kaplan, N.B.** 1983. Proliferation of alveolar interstitial cells during postnatal groth: Evidence of two distinct populations of pulmonary fibroblasts. *Am, Rev. Respir. Dis.* **127**:763-770.
15. **Brown, R., Ormsby, I., Doetschman, T., Greenhalgh, D.** 1995. Wound Healing in the transforming growth factor- β 1 - deficient mouse. *Wound Rep Reg*:25-36.
16. **Bulgrin, J., Shabani, M., Chakravarthy, D., Smith, D.** 1995. Nitic Oxide

- Synthesis is Suppressed in Steroid-Impaired and Diabetic Wounds. *Wounds*:48-57.
17. **Buttner, C., A. Skupin, T. Reimann, E. P. Rieber, G. Unteregger, P. Geyer, and K. H. Frank.** 1997. Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**:315-25.
 18. **Castor, C. W., Prince, R.K., Dorstewitz, E. L.** 1962. Characteristics of human fibroblast cultivated in vitro from different anatomic sites. *Lab Invest* **11**:703-713.
 19. **Cederbaum SD, Y. H., Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK.** 2004. Arginase I and II: do their function overlap? *Mol Genet Metab* **81**:38-44.
 20. **Clark, R. A.** 1993. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* **306**:42-8.
 21. **Clark, R. A. F.** 1996. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Second Edition ed. Plenum Press, New York and London.
 22. **Clore, J. N., I. K. Cohen, and R. F. Diegelmann.** 1979. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* **161**:337-40.
 23. **Closs, E. I.** 1996. Cats, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporter. *Amino Acids* **11**:193-208.
 24. **Coccia, E. M., E. Stellacci, G. Marziali, G. Weiss, and A. Battistini.** 2000. IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. *Int Immunol* **12**:977-85.
 25. **Connelly, L., M. Palacios-Callender, C. Ameixa, S. Moncada, and A. J. Hobbs.** 2001. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* **166**:3873-81.
 26. **Cowin, A. J., T. M. Holmes, P. Brosnan, and M. W. Ferguson.** 2001. Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol* **11**:424-31.
 27. **Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani.** 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* **63**:21-9.
 28. **De Caterina, R., P. Libby, H. B. Peng, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. Gimbrone, Jr., W. S. Shin, and J. K. Liao.** 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **96**:60-8.
 29. **Derdak, S., P. Dixon, H. Watts, D. Penney, and R. Phipps.** 1991. CD4 expression in lung fibroblasts. *Lancet* **337**:374.
 30. **Deves, R., and C. A. Boyd.** 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* **78**:487-545.
 31. **Diegelmann, R. F., L. C. Rothkopf, and I. K. Cohen.** 1975. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. *J Surg Res* **19**:239-43.
 32. **DiPiro, J. T., T. R. Howdieshell, J. K. Goddard, D. B. Callaway, R. G. Hamilton, and A. R. Mansberger, Jr.** 1995. Association of interleukin-4 plasma levels with traumatic injury and clinical course. *Arch Surg* **130**:1159-62; discussion 1162-3.
 33. **Doillon, C. J., M. G. Dunn, E. Bender, and F. H. Silver.** 1985. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res* **5**:481-92.

34. **Durante, W., L. Liao, S. V. Reyna, K. J. Peyton, and A. I. Schafer.** 2001. Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation* **103**:1121-7.
35. **Endo M, O. S., Terasaki Y, Takeya M, Suga M, Mori M, Gotoh T.** 2003. Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **L3**:13-21.
36. **Ford, H. R., R. A. Hoffman, E. J. Wing, D. M. Magee, L. McIntyre, and R. L. Simmons.** 1989. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* **124**:1422-8.
37. **Fries, K. M., T. Blieden, R. J. Looney, G. D. Sempowski, M. R. Silvera, R. A. Willis, and R. P. Phipps.** 1994. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* **72**:283-92.
38. **Gay, S., J. Vijanto, J. Raekallio, and R. Penttinen.** 1978. Collagen types in early phases of wound healing in children. *Acta Chir Scand* **144**:205-11.
39. **Goodson, W. H., 3rd, and T. K. Hunt.** 1986. Wound collagen accumulation in obese hyperglycemic mice. *Diabetes* **35**:491-5.
40. **Gotoh, T., M. Araki, and M. Mori.** 1997. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **233**:487-91.
41. **Gottrup, F., Argen, M.,Karlsmark,T.** 2000. Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and vivo adult soft tissue. *Wound Rep Reg* **8**:83-86.
42. **Grody, W. W., C. Argyle, R. M. Kern, G. J. Dizikes, E. B. Spector, A. D. Strickland, D. Klein, and S. D. Cederbaum.** 1989. Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia. Enzymatic, pathologic, and molecular analysis. *J Clin Invest* **83**:602-9.
43. **Grotendorst, G.** 1992. Chemoattractants and Groth factors, Philadelphia.
44. **Guo, F. H., K. Uetani, S. J. Haque, B. R. Williams, R. A. Dweik, F. B. Thunnissen, W. Calhoun, and S. C. Erzurum.** 1997. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest* **100**:829-38.
45. **Hakvoort, T., V. Altun, P. P. van Zuijlen, W. I. de Boer, W. A. van Schadewij, and T. H. van der Kwast.** 2000. Transforming growth factor-beta(1), -beta(2), -beta(3), basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression in keratinocytes of burn scars. *Eur Cytokine Netw* **11**:233-39.
46. **Holzheimer, R. G., and W. Steinmetz.** 2000. Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds. *Eur J Med Res* **5**:347-55.
47. **Ibelgaufts, H.** 2002, posting date. IL 4. [Online.]
48. **Ibelgaufts, H.** 1995. TGF- β , p. 685-693. *In* Roche (ed.), *Dictionary of Cytokines*, first ed, Basel, Switzerland.
49. **Iyer, R., C. P. Jenkinson, J. G. Vockley, R. M. Kern, W. W. Grody, and S. Cederbaum.** 1998. The human arginases and arginase deficiency. *J Inher Metab Dis* **21**:86-100.
50. **Iyer, R. K., J. M. Bando, C. P. Jenkinson, J. G. Vockley, P. S. Kim, R. M. Kern, S. D. Cederbaum, and W. W. Grody.** 1998. Cloning and characterization

- of the mouse and rat type II arginase genes. *Mol Genet Metab* **63**:168-75.
51. **J.P. Bulgrin, M. S., D.J. Smith.** 1993. Arginine-free diet supresses nitric oxide production in wounds. *J. Nutr. Biochem.* **4**:588.
 52. **Jenkinson, C. P., W. W. Grody, and S. D. Cederbaum.** 1996. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **114**:107-32.
 53. **Jude, E. B., R. Blakytny, J. Bulmer, A. J. Boulton, and M. W. Ferguson.** 2002. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* **19**:440-7.
 54. **Kaempfer H, P. J., Frank S.** 2003. Expression an Activity of Arginase Isoenzymes During Normal and Diabetes-Impaired Skin Repair. *The Journal f Investigative Dermatology* **121**:1544-1551.
 55. **Kakuda, D. K., Finely, K. D., Dionne, V. E., and C. L. MacLeod.** 1993. Two distinct gene products mediate y+ type cationic amino acid transporter in *Xenopus* oocytes and show diffrent expression pattern. *Transgene* **1**:91-101.
 56. **Kakuda, D. K., and C. L. MacLeod.** 1994. Na(+)-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. *J Exp Biol* **196**:93-108.
 57. **Kampfer H, P. J., Frank S.** 2003. Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair. *J Invest Dermatol* **121(6)**:1544-51.
 58. **Kang, J. L., K. Lee, and V. Castranova.** 2000. Nitric oxide up-regulates DNA-binding activity of nuclear factor-kappaB in macrophages stimulated with silica and inflammatory stimulants. *Mol Cell Biochem* **215**:1-9.
 59. **Kim, J. W., E. I. Closs, L. M. Albritton, and J. M. Cunningham.** 1991. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* **352**:725-8.
 60. **Kurkinen, M., A. Vaheri, P. J. Roberts, and S. Stenman.** 1980. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* **43**:47-51.
 61. **Lee, P. C., A. N. Salyapongse, G. A. Bragdon, L. L. Shears, 2nd, S. C. Watkins, H. D. Edington, and T. R. Billiar.** 1999. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol* **277**:H1600-8.
 62. **Lee, R. H., D. Efron, U. Tantry, and A. Barbul.** 2001. Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *J Surg Res* **101**:104-8.
 63. **Li, H., C. J. Meininger, J. R. Hawker, Jr., T. E. Haynes, D. Kepka-Lenhart, S. K. Mistry, S. M. Morris, Jr., and G. Wu.** 2001. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**:E75-82.
 64. **Löffler, G., Petrides, P. E.** 1997. *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Honkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio.
 65. **Louis, C. A., V. Mody, W. L. Henry, Jr., J. S. Reichner, and J. E. Albina.** 1999. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* **276**:R237-42.
 66. **Lynch, S. E., R. B. Colvin, and H. N. Antoniades.** 1989. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* **84**:640-6.
 67. **MacLeod, C. L.** 1996. Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:846-852.
 68. **MacLeod, C. L., Finely, K., and Kakuda, D. K.** 1994. y+-type cationic amino

- acid transporter: expression and regulation of the mCAT genes. *J. Exp. Biol.* **196**:109-121.
69. **MacLeod, C. L., Kakuda, D. K.** 1996. Regulation of CAT: cationic amino acid transporter gene expression. *Amino Acids* **11**:171-191.
 70. **Madden, J. W., and E. E. Peacock, Jr.** 1968. Studies on the biology of collagen during wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. *Surgery* **64**:288-94.
 71. **Miller, E. J.** 1976. Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens. *Mol Cell Biochem* **13**:165-92.
 72. **Mollenhauer, J., and K. Bayreuther.** 1986. Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation* **32**:165-72.
 73. **Mori, M., and T. Gotoh.** 2000. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:715-9.
 74. **Mossner, J., R. Hammermann, and K. Racke.** 2001. Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulm Pharmacol Ther* **14**:297-305.
 75. **Most, D., D. T. Efron, H. P. Shi, U. S. Tantry, and A. Barbul.** 2002. Characterization of incisional wound healing in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* **132**:866-76.
 76. **Munder, M., Eichmann K., Moran JM, Centeno G, Modolell M.** 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* **163**:3771-3777.
 77. **Nathan, C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* **6**:3051-64.
 78. **Nelin, L. D., G. S. Krenz, L. G. Chicoine, C. A. Dawson, and R. M. Schapira.** 2002. L-Arginine uptake and metabolism following in vivo silica exposure in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**:348-55.
 79. **Nelson G, W. J., Spiller G, Sullivan E, Unitt F, White RH.** 2002. Dynamic analysis of STAT6 signalling in living cells. *FEBS Lett* **532**:188-192.
 80. **Nishimura, T., T. Nishiura, S. deSerres, T. Nakagawa, D. A. Brenner, and A. A. Meyer.** 2000. Impact of burn injury on hepatic TGF-beta1 expression and plasma TGF-beta1 levels. *J Trauma* **48**:39-44.
 81. **Oriente, A., N. S. Fedarko, S. E. Pacocha, S. K. Huang, L. M. Lichtenstein, and D. M. Essayan.** 2000. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* **292**:988-94.
 82. **Ozaki, M., T. Gotoh, A. Nagasaki, K. Miyanaka, M. Takeya, S. Fujiyama, K. Tomita, and M. Mori.** 1999. Expression of arginase II and related enzymes in the rat small intestine and kidney. *J Biochem (Tokyo)* **125**:586-93.
 83. **Paludan, S. R., J. Lovmand, S. Ellermann-Eriksen, and S. C. Mogensen.** 1997. Effect of IL-4 and IL-13 on IFN-gamma-induced production of nitric oxide in mouse macrophages infected with herpes simplex virus type 2. *FEBS Lett* **414**:61-4.
 84. **Pegg, A. E., and P. P. McCann.** 1982. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* **243**:C212-21.
 85. **Popik, W., and A. D. Ingnot.** 1991. Combined action of interferons and transforming growth factor beta on the proliferation of human fibroblasts. *Arch Immunol Ther Exp* **39**:19-26.

86. **Raghu, G., Y. Y. Chen, V. Rusch, and P. S. Rabinovitch.** 1988. Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* **138**:703-8.
87. **Reade, M. C., M. F. Clark, J. D. Young, and C. A. Boyd.** 2002. Increased cationic amino acid flux through a newly expressed transporter in cells overproducing nitric oxide from patients with septic shock. *Clin Sci (Lond)* **102**:645-50.
88. **Regan MC, K. S., Wasserkrug HL, Barbul A.** 1991. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J Surg Res* **5**:442-8.
89. **Reichner, J. S., A. J. Meszaros, C. A. Louis, W. L. Henry, Jr., B. Mastrofrancesco, B. A. Martin, and J. E. Albina.** 1999. Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *Am J Pathol* **154**:1097-104.
90. **Rizk M., W. M., Barbul A.** 2004. Nitric Oxide and Wound Healing. *World Journal of Surgery* **28**:301-306.
91. **Roitt, I., Brostoff J., David, M.** 1998. *Immunology*, Fifth Edition ed. Mosby, London, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Tokyo.
92. **Saefel M Krueger a, A. S., Heussler V, Racz P, Fleischer B, Brombacher F, Hoerauf A.** 2003. Mice Deficient in Interleukin-4 (IL-4) or IL-4 Receptor Have Higher Resistance to Sporozoite Infection with *Plasmodium berghei* (ANKA) than Do Naive Wild-Type Mice. *Infection and Immunity*:322-331.
93. **Salmon-Ehr, V., P. Gillery, B. Kalis, J. Banchemau, and F. X. Maquart.** 1994. [Interleukin-4: from B-lymphocyte to fibroblast]. *Pathol Biol (Paris)* **42**:262-8.
94. **Salmon-Ehr, V., L. Ramont, G. Godeau, P. Birembaut, M. Guenounou, P. Bernard, and F. X. Maquart.** 2000. Implication of interleukin-4 in wound healing. *Lab Invest* **80**:1337-43.
95. **Sands, W. A., V. Bulut, A. Severn, D. Xu, and F. Y. Liew.** 1994. Inhibition of nitric oxide synthesis by interleukin-4 may involve inhibiting the activation of protein kinase C epsilon. *Eur J Immunol* **24**:2345-50.
96. **Schaffer, M. R., P. A. Efron, F. J. Thornton, K. Klingel, S. S. Gross, and A. Barbul.** 1997. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol* **158**:2375-81.
97. **Schaffer, M. R., U. Tantry, S. S. Gross, H. L. Wasserburg, and A. Barbul.** 1996. Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res* **63**:237-40.
98. **Schaffer, M. R., U. Tantry, F. J. Thornton, and A. Barbul.** 1999. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg* **165**:262-7.
99. **Seifter, E., G. Rettura, A. Barbul, and S. M. Levenson.** 1978. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* **84**:224-30.
100. **Sempowski, G., Borrello, M., Blieden, T., Barth, R., Phipps, R.** 1996. Fibroblast heterogeneity in the healing wound. *Wound Rep Reg*:120-31.
101. **Sempowski, G. D., M. P. Beckmann, S. Derdak, and R. P. Phipps.** 1994. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol* **152**:3606-14.
102. **Sempowski, G. D., S. Derdak, and R. P. Phipps.** 1996. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *J Cell Physiol* **167**:290-6.

103. **Shi O, M. S. J., Zoghbi H, Porter CW, O'Brien WE.** 2001. Generation of a mouse model for arginase II deficiency by targeted disruption of the arginase II gene. *Mol Cell Biol.* **21(3):**811-3.
104. **Shukla, A., A. M. Rasik, and R. Shankar.** 1999. Nitric oxide inhibits wounds collagen synthesis. *Mol Cell Biochem* **200:**27-33.
105. **Simmons, W. W., E. I. Closs, J. M. Cunningham, T. W. Smith, and R. A. Kelly.** 1996. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *J Biol Chem* **271:**11694-702.
106. **Struzyna, J., Z. Pojda, B. Braun, M. Chomicka, E. Sobiczewska, and J. Wrembel.** 1995. Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) in burned patients. *Burns* **21:**437-40.
107. **Thornton, F. J., M. R. Schaffer, M. B. Witte, L. L. Moldawer, S. L. MacKay, A. Abouhamze, C. L. Tannahill, and A. Barbul.** 1998. Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. *Biochem Biophys Res Commun* **246:**654-9.
108. **Trautmann, A., G. Krohne, E. B. Brocker, and C. E. Klein.** 1998. Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell- cell adhesion and action of IL-4. *J Immunol* **160:**5053-7.
109. **Tredget, E. E., H. A. Shankowsky, R. Pannu, B. Nedelec, T. Iwashina, A. Ghahary, T. V. Taerum, and P. G. Scott.** 1998. Transforming growth factor-beta in thermally injured patients with hypertrophic scars: effects of interferon alpha-2b. *Plast Reconstr Surg* **102:**1317-28; discussion 1329-30.
110. **Tredget, E. E., R. Wang, Q. Shen, P. G. Scott, and A. Ghahary.** 2000. Transforming growth factor-beta mRNA and protein in hypertrophic scar tissues and fibroblasts: antagonism by IFN-alpha and IFN-gamma in vitro and in vivo. *J Interferon Cytokine Res* **20:**143-51.
111. **Ulland, A. E., J. D. Shearer, C. Coulter, and M. D. Caldwell.** 1997. Altered wound arginine metabolism by corticosterone and retinoic acid. *J Surg Res* **70:**84-8.
112. **Van Elsen, A. F., and J. G. Leroy.** 1975. Arginase isoenzymes in human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **62:**191-8.
113. **Vockley, J. G., C. P. Jenkinson, H. Shukla, R. M. Kern, W. W. Grody, and S. D. Cederbaum.** 1996. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* **38:**118-23.
114. **Vodovotz, Y.** 1997. Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric Oxide:*3-17.
115. **Vogt, P. M., M. Lehnhardt, D. Wagner, V. Jansen, M. Krieg, and H. U. Steinau.** 1998. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast Reconstr Surg* **102:**117-23.
116. **Wang, X., X. Niu, and D. Cheng.** 1997. [TGF-beta 1 gene expression in the healing process of skin wound in rat]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **11:**257-60.
117. **Watts, H., Zwillich, S., Felch, M., Derdak, S., Penney, D., Keng, P., Phipps, R.** 1991. A subset of human lung fibroblast express class MHC II antigens. *Am. Rev. Respir. Dis.* **A230:**143.
118. **Wei, S., M. W. Wang, S. L. Teitelbaum, and F. P. Ross.** 2002. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-

- activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **277**:6622-30.
119. **Witte, M. B., and A. Barbul.** 1997. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* **77**:509-28.
 120. **Witte, M. B., and A. Barbul.** 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* **183**:406-12.
 121. **Witte, M. B., A. Barbul, M. A. Schick, N. Vogt, and H. D. Becker.** 2002. Upregulation of arginase expression in wound-derived fibroblasts. *J Surg Res* **105**:35-42.
 122. **Wrana, J. L., J. Sodek, R. L. Ber, and C. G. Bellows.** 1986. The effects of platelet-derived transforming growth factor beta on normal human diploid gingival fibroblasts. *Eur J Biochem* **159**:69-76.
 123. **Wu, G., and S. M. Morris, Jr.** 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **336**:1-17.
 124. **XY,** posting date. Cytokines in Wound Healing. RnDSystems. [Online.]
 125. **Yamasaki, K., H. D. Edington, C. McClosky, E. Tzeng, A. Lizonova, I. Kovesdi, D. L. Steed, and T. R. Billiar.** 1998. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* **101**:967-71.
 126. **Yi, E. S., A. Bedoya, H. Lee, E. Chin, W. Saunders, S. J. Kim, D. Danielpour, D. G. Remick, S. Yin, and T. R. Ulich.** 1996. Radiation-induced lung injury in vivo: expression of transforming growth factor-beta precedes fibrosis. *Inflammation* **20**:339-52.
 127. **Zeiber, A. M., B. Fisslthaler, B. Schray-Utz, and R. Busse.** 1995. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* **76**:980-6.
 128. **Zhang, K., W. Garner, L. Cohen, J. Rodriguez, and S. Phan.** 1995. Increased types I and III collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA and protein in hypertrophic burn scar. *J Invest Dermatol* **104**:750-4.

Danksagung:

Für das Gelingen dieser Arbeit waren eine ganze Reihe von Personen wichtig.

Ohne das außergewöhnliche große Engagement von Frau PD Dr. med. Maria Witte wäre diese Arbeit unmöglich gewesen. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Auch bei Ihrem Ehemann, Dr. med. Georg Lamprecht, der uns nicht nur hervorragende Primersequenzen herstellte, sondern auch oft auf seine Frau verzichten musste, möchte ich auf diesem Wege mein Dank aussprechen.

Ganz herzlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und daraus die Möglichkeit der Promotion erst ermöglicht haben. Auch möchte ich diesen beiden für die stundenlangen Korrekturlesungen danken.

Für die uneingeschränkte Unterstützung, die selbst über Jahre nicht weniger wurde, sondern im Gegenteil wuchs, will ich meiner lieben Frau Judith an dieser Stelle danken. Ohne sie wären einige Wochen, wenn nicht Monate bedeutend schwieriger gewesen.

Des weiteren möchte ich Frau Dr. Silvia Wagner danken, die mich während der praktischen Arbeit im Labor sehr oft tatenreich unterstützte.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Karin Schillbach für den regen Gedankenaustausch.

Ich wünsche allen weiteren Doktoranden genauso viel Spaß, Erfolg und Begeisterung an der medizinischen Forschung wie ich es erfahren durfte.

Würzburg im Juni 2006

Martin Schick

Lebenslauf:

Geboren am 19.11.1976 in Tübingen

- 1996 Abitur am Albert-Einstein-Gymnasium Ravensburg
- 1996/97 Zivildienst im Rettungsdienst der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V., Kreisverband Ravensburg
- 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
- 1999 Physikum in Jena
- 2000 1. Staatsexamen in Jena
- 2000 Fortführung des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
- 2003 2. Staatsexamen an der Eberhard-Karls- Universität in Tübingen
- 10.11 2004 3. Staatsexamen in Friedrichshafen
- ab 2004 Beginn der Facharztausbildung für Anästhesie in Wangen i.A.
- 2005 Fortführung der Facharztausbildung an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg