

TADJRISCHI, NESCHAAT

---

# Die Rolle von IL-17E in der epidermalen Homöostase



INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

# **Die Rolle von IL-17E in der epidermalen Homöostase**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Tadjrischi, Neschaat**  
aus Frankfurt am Main

Gießen 2020

Aus dem Biochemischen Institut,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Lienhard Schmitz,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Jung

Tag der Disputation: 03.09.2020

***Meiner Familie***

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Aufbau und Funktion humaner Haut</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Psoriasis vulgaris</b>	<b>2</b>
1.2.1	Klinik	3
1.2.2	Epidemiologie	4
1.2.3	Genetik und Umweltfaktoren	5
1.2.4	Histologie	6
1.2.5	Pathogenese	7
1.2.6	Therapie	8
1.3	<b>Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg und seine Funktion in der epidermalen Homöostase</b>	<b>9</b>
1.3.1	Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg	9
1.3.2	Die Rolle des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Regulation der epidermalen Homöostase	12
1.3.3	Die Rolle des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Psoriasis-Pathogenese	13
1.4	<b>Die Rolle der IL-17 Zytokinfamilie in der Psoriasis-Pathogenese</b>	<b>14</b>
1.5	<b>Die Rolle von IL-17E in der Psoriasis-Pathogenese</b>	<b>16</b>
1.6	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.1	Technische Geräte und Software	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.4	Zytokine	22
2.1.5	Antikörper	23
2.1.6	Chemischen Inhibitoren	24
2.1.7	Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer	24
2.1.8	Zellen	25
2.2	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.2	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot	27
2.2.3	Differenzierungsversuch von Keratinozyten in zweidimensionaler Kultur	29
2.2.4	Analyse der Zellproliferation mittels WST	29
2.2.5	Herstellung eines dreidimensionalen Epidermismodells	29

2.2.6	Histologie und immunhistologische Färbung .....	30
2.2.7	Statistische Auswertung.....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Untersuchung IL-17E-induzierter Signaltransduktionskaskaden in Keratinocyten .....	33
3.2	Untersuchung der Wirkung von IL-17E auf die Proliferation von Keratinocyten .....	37
3.3	Untersuchung der Wirkung von IL-17E auf die Differenzierung von Keratinocyten in zweidimensionaler Kultur.....	39
3.4	Untersuchung der Wirkung von IL-17E in einem dreidimensionalen Epidermismodell .....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1	Bewertung zellulärer Modellsysteme zur Untersuchung der Wirkung von Zytokinen .....	48
4.2	IL-17E - ein neuer Spieler in der Psoriasis-Pathogenese?.....	49
4.2.1	Psoriasis-typische Merkmale von IL-17E.....	50
4.2.2	Distinktive Merkmale von IL-17E gegenüber anderen Psoriasis-typischen Zytokinen.....	53
4.3	IL-17E als neues Target für die Psoriasis-Therapie?.....	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	60
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	63
7.3	Tabellenverzeichnis .....	64
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>76</b>
9.1	Nutzungsgenehmigung von Abbildungen aus Fremdquellen .....	76
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>78</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>79</b>
<b>13</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>80</b>

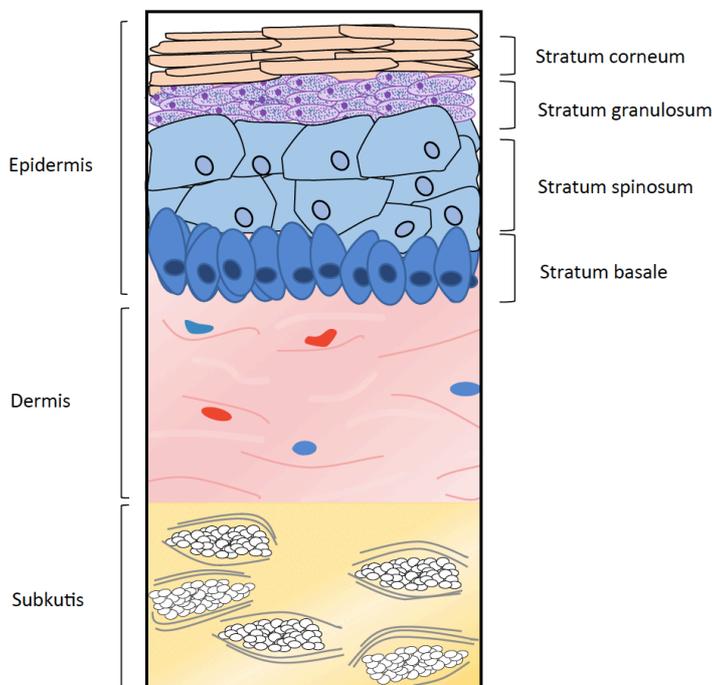


# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion humaner Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und erfüllt verschiedene essentielle Aufgaben. Sie dient zum Schutz vor schädlichen Reizen, zur Körpertemperaturregulation und Sinneswahrnehmung [1].

Die Haut ist aus drei Schichten aufgebaut: Die Epidermis (Oberhaut) besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel. Die darunterliegende Dermis (Lederhaut) ist ein straffes mit Talgdrüsen und Blutgefäßen durchzogenes Bindegewebe. Die Subkutis (Unterhaut) besteht aus einem lockeren Bindegewebe mit mehr oder weniger eingelagertem Fettgewebe (Abb. 1) [2,3].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Haut**

Die Haut besteht aus drei Schichten, der Epidermis, der Dermis und der Subkutis.

Während die Subkutis als Energiespeicher und Druckpolster fungiert, dient die Dermis der mechanischen Widerstandsfähigkeit. Das Plattenepithel der Epidermis besteht vor allem aus spezifischen Epithelzellen, den Keratinozyten, sowie Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen [1].

Die Epidermis unterliegt einer kontinuierlichen Erneuerung, sodass es sich hier um ein Proliferationsgewebe handelt. Dazu proliferieren die Keratinozyten der basalen epidermalen Schicht, in der unter normalen Bedingungen zahlreiche Mitosen und Zellteilungen stattfinden. Während eine Tochterzelle basal erhalten bleibt, differenziert die Andere zur Hornzelle (Korneozyt), um schließlich als Hornschuppe abgeschilfert zu werden [2]. Die Schichten der Epidermis setzen sich dementsprechend aus Zellen des gleichen Differenzierungsgrads zusammen (Abb. 1) [4].

Während der Differenzierung werden verschiedene Strukturproteine gebildet, die im Verlauf biochemisch umgewandelt werden und schließlich zur Bildung von Hornzellen (Korneozyten) und damit der Ausbildung der schützenden Hornschicht (Stratum corneum) beitragen. Die Expression dieser Proteine, vor allem Keratine, findet während der Differenzierung in einer definierten Kombination und Reihenfolge statt. Basale Zellen exprimieren die niedermolekularen Keratine-5 und 14. Zellen des Stratum spinosum teilen sich nicht mehr und exprimieren die höhermolekularen Zytokeratine Keratin-1 und 10 sowie Caspase-14. In dieser Phase findet die Synthese der Moleküle statt, welche für die Keratinisierung der Epidermis notwendig ist, unter anderem die genannten Zytokeratine, Filaggrin, Loricrin, Involucrin sowie Lipide [2]. Das Enzym Transglutaminase-1 vernetzt diese Proteine und ermöglicht damit die mechanische Stabilität der Epidermis [5]. Im Transformationsstadium werden durch die Freisetzung von verschiedenen lysosomalen Enzymen Zellkern und Organellen abgebaut. Beim Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum führt die Caspase-14 dann zum Filaggrinabbau [6]. Das Filaggrin wird in freie Aminosäuren zersetzt, welche als Natural-Moisturizing-Factors (NMF) dienen und den Wasserhaushalt der Haut durch dessen Wasserbindungsvermögen aufrechterhalten [7]. Im Stratum corneum bilden die kern- und organellenlosen Hornzellen nun zusammen mit Lipiden und feuchtigkeitsbindenden Faktoren die schützende Hornschicht, welche schließlich abgeschilfert wird [2,4].

## 1.2 Psoriasis vulgaris

Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronische, schubweise verlaufende, entzündliche Hauterkrankung und zählt wie der Morbus Crohn oder die rheumatoide Arthritis aufgrund ihrer Pathophysiologie sowie genetischer Aspekte zur Gruppe der autoimmunvermittelten, chronisch-inflammatorischen Erkrankungen. Die Psoriasis vulgaris zeigt sich durch chronisch-stationäre, scharf umschriebene erythematosquamöse Plaques an den Streckseiten der Extremitäten, der Kopfhaut und im Lumbalbereich [8]. Betroffen sind Haut und Nägel, seltener auch Gelenke. An Psoriasis

vulgaris erkrankte Patienten haben eine erheblich beeinträchtigte Lebensqualität, verursacht durch körperliche und psychische Einschränkungen [8,9].

### 1.2.1 Klinik

Die häufigste Form der Psoriasis ist die Psoriasis vulgaris vom Plaque-Typ und betrifft 90% der Fälle [8]. Die klinische Primäreffloreszenz ist charakterisiert durch scharf umschriebene, einzelne ovale oder runde erythemato-squamöse Plaques, welche später zu Größeren konfluieren. Die Plaques sind von silbrig schimmernden Schuppen bedeckt (Abb. 2a) [10–12]. Überwiegend ist dieses Erscheinungsbild an den Prädilektionsstellen, den Streckseiten der Extremitäten (Ellenbogen, Knie, Kopfhaut, Bauchnabel, Lendenregion) zu erkennen (Abb. 2a, 2e, 2f) [11,13].

Zu den selteneren Formen gehört die Psoriasis guttata (lat. gutta = Tropfen), die durch zahlreiche 2-10mm kleine Läsionen gekennzeichnet ist. Oft tritt diese Form der Erstmanifestation nach einer Streptokokken-Infektion auf. Ein späterer Übergang in die Psoriasis vulgaris ist möglich (Abb. 2d) [10,13]. Sind die Plaques bevorzugt an großen Hautfalten (Inguinalfalten, Submammärregion, Axillen, Analfalte) zu finden, wird von einer Psoriasis intertriginosa gesprochen. Psoriasis inversa ist im Gegensatz zu den üblichen Prädilektionsstellen an den Beugeseiten der Extremitäten lokalisiert [13]. Bei der pustulösen Psoriasis kommt es in akuten Phasen zu pustulösen Eruptionen auf geröteter Haut. Ist der gesamte Körper betroffen, spricht man von einer Psoriasis pustulosa generalisata Typ Zumbusch [2]. Die Psoriasis palmoplantar pustulosis (PPP) bezeichnet das Auftreten von gelben bis braunen Pusteln an Handflächen und Fußsohlen [13].

50% der Psoriasis-Patienten weisen zudem Nagelveränderungen auf. Bei den sogenannten Tüpfelnägeln sind Einkerbungen auf den Nägeln zu beobachten. Ebenfalls werden „Ölflecken“, gelb-bräunliche Verfärbungen, beschrieben. Grund hierfür ist eine Parakeratose. Diese Nagelveränderungen können bis zu einer Dystrophie reichen (Abb. 2c) [2]. 5-20% der Psoriasis-Patienten leiden zusätzlich an der Psoriasis-Arthritis (Abb. 2b) [11].

Abgesehen von der kräftezehrenden Hauterkrankung, welche schon allein dadurch einen negativen Einfluss auf die Lebensqualität hat, ist die Psoriasis noch zusätzlich mit anderen systemischen und psychischen Komorbiditäten assoziiert, welche zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei Psoriasis-Patienten beitragen [14].

Es wird insbesondere eine Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben. Durch entzündungsbedingte Insulinresistenz kommt es zur endothelialen Dysfunktion, welche zu Arteriosklerose und letztlich zum Myokardinfarkt oder Schlaganfall führt [8,15,16]. Hinzu kommt, dass eine Korrelation zwischen Psoriasis

und dem metabolischen Syndrom besteht, eine Kombination von Dyslipidämie, Hypertonie, Adipositas, Insulinresistenz und Thrombophilie [15,17]. Die gesamte Belastung führt dazu, dass Psoriasis-Patienten häufiger depressiv sind und im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung vermehrt Suizidgedanken haben [8,16].



**Abbildung 2: Klinische Merkmale der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [11])**

Kennzeichnend für die Psoriasis vulgaris ist die scharf begrenzte erythematöse Plaque, welche von silbrig weißen Schuppen bedeckt ist (a). Bis zu 20% der Erkrankten haben eine Psoriasis-Arthritis, bei der die Gelenke ebenfalls entzündlich beteiligt sind (b). Nagelveränderungen sind häufige Begleitscheinungen der Psoriasis-Patienten (c). Erste Erscheinungen der Psoriasis können eine Psoriasis guttata, nach einer beta-Streptokokken-Infektion sein (d). Sterile kleine Pusteln können bei Psoriasis vulgaris auftreten, welche hier an einer der Prädilektionsstellen, nämlich am Bauchnabel, dargestellt sind (e). 50% der Psoriasis-Patienten weisen eine Kopfhaarbeteiligung mit einem schmalen Saum am Haaransatz auf (f).

### 1.2.2 Epidemiologie

In westlichen Industrienationen ist Psoriasis vulgaris mit einer Prävalenz von 1,5-2% die häufigste Form dieser Erkrankung [9]. Die Inzidenz bei Schwarzafrikanern und Asiaten ist sichtlich niedriger [12]. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen.

Man unterscheidet zwischen zwei Formen der Psoriasis vulgaris:

Während der Typ I in 60-70% der Fälle vorkommt, ist beim Typ II eine Häufigkeit von 30-40% beschrieben. Der Typ I ist durch eine Frühmanifestation in einem Alter von unter 40 Jahren, einer hohen familiären Belastung und einer Assoziation zum HLA-Cw6 und -DR7 charakterisiert. Klinisch sind die Fälle schwerwiegender.

Bei Typ II erscheint die Erstmanifestation nach dem 40. Lebensjahr. Außerdem zeichnet er sich durch eine negative Familienanamnese aus. Die Assoziation mit HLA-Typen ist gering [2,13].

### 1.2.3 Genetik und Umweltfaktoren

Psoriasis wird als multifaktorielle Erkrankung angesehen, die durch die Interaktion zwischen vererbten Suszeptibilitätsallelen und Umweltauslösern verursacht wird. So zeigt sich eine familiäre Häufung. Die Wahrscheinlichkeit eines Kindes an Psoriasis zu erkranken liegt bei 41%, wenn beide Elternteile erkrankt sind. Ist lediglich ein Elternteil betroffen, beträgt das Risiko 8,1%. In einer Studie mit Zwillingen wurde festgestellt, dass das Manifestationsrisiko bei eineiigen Zwillingen für beide 35-72% beträgt, bei Zweieiigen sind es 12-30% [2,18].

Es konnten insgesamt über 60 Genomregionen identifiziert werden, die mit Auftreten von Psoriasis assoziiert wurden. So tritt beispielsweise eine starke Assoziation zwischen dem HLA-Cw6-Allel und Psoriasis auf. Zusätzlich sind noch zahlreiche andere Suszeptibilitätsgene bekannt, welche die Empfänglichkeit für eine erbliche Erkrankung erhöhen. Dazu gehört PSORS-1 (Psoriasis susceptibility gene 1) auf dem Chromosom 6, welcher im Bereich des MHC (major histocompatibility complex) liegt. Darüber hinaus gibt es andere Genloki, die in der Pathogenese eine große Rolle spielen. Es handelt sich um Gene, die mit der Hautbarrierefunktion und TH17-Zellaktivierung in Verbindung gebracht werden [18–20].

Zusätzlich gibt es für die Exazerbation der Psoriasis mehrere Triggerfaktoren. Das Klima, insbesondere die Sonnenexposition scheinen Auswirkungen auf die Prävalenz zu haben. Im Sommer kommt es zu einer Besserung der Symptome, im Winter zu einer Verschlechterung. Grund dafür ist das UV-Licht, welches eine anti-entzündliche Wirkung besitzt, da die UV-Strahlung unter anderem regulatorische T-Zellen induziert, welche immunsuppressiv wirken [2,8,18].

Infektionen, insbesondere eine vorausgegangene Streptokokken-Infektion des oberen Respirationstraktes, können bei Kindern eine Psoriasis auslösen. Ursache ist eine Ähnlichkeit zwischen den Streptokokken-Proteinen und Keratinozytenantigenen. Das Immunsystem wird durch Keratine stimuliert, somit wird dieses gegen körpereigene Antigene gerichtet, was als molekulare Mimikry bezeichnet wird. Ferner scheint die Prävalenz bei HIV-infizierten Patienten erhöht. Zudem ist diese Gruppe schwieriger zu therapieren.

Darüber hinaus können Traumata wie eine unspezifische, mechanische Reizung zu einem sogenannten Köbner-Phänomen bzw. isomorphen Reizeffekt führen. Dabei kommt es an einer vorher nicht erkrankten Stelle mit einer Latenz von 7 bis 14 Tagen

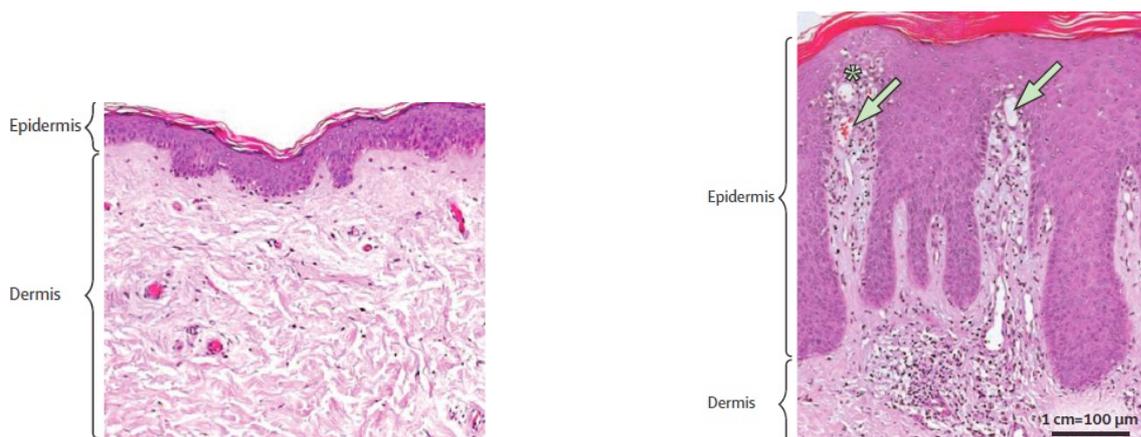
zu einer Hautveränderung, die den krankheitsbedingten Läsionen gleicht bzw. isomorph sind. Auch Medikamente wie Betablocker, Antimalariamittel und Lithium können zu einer Exazerbation führen. Weiterhin scheint Stress, als psychische Komponente, von Bedeutung zu sein [2,8].

#### 1.2.4 Histologie

Im Gegensatz zur gesunden Haut (Abb. 3a) entsteht in psoriatischer Haut das Bild einer veränderten Zellschichtung. Es entsteht eine Akanthose (Verbreiterung des Stratum spinosum) sowie durch vermehrte Aktivierung der Keratinozyten eine Hypogranulose (Verschmälerung des Stratum granulosum), eine Hyperkeratose (Verdickung des Stratum corneum) und eine Parakeratose (pathologische Erhaltung der Zellkerne im Stratum corneum) mit Schuppenbildung. Die Reteleisten der Epidermis sind deutlich verlängert und die Papillen der Dermis sind hochreichend. Zudem entstehen dilatierte Blutgefäße in den Papillenspitzen der Dermis. Außerdem sind Munro-Mikroabszesse ein typisches histopathologisches Merkmal der Psoriasis, welche durch Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Epidermis entstehen. Insgesamt ist sowohl in der Epidermis, als auch in der Dermis ein proinflammatorisches Infiltrat mit T-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten sichtbar (Abb. 3b) [8,11,21].

(a) gesunde Haut

(b) psoriatische Haut



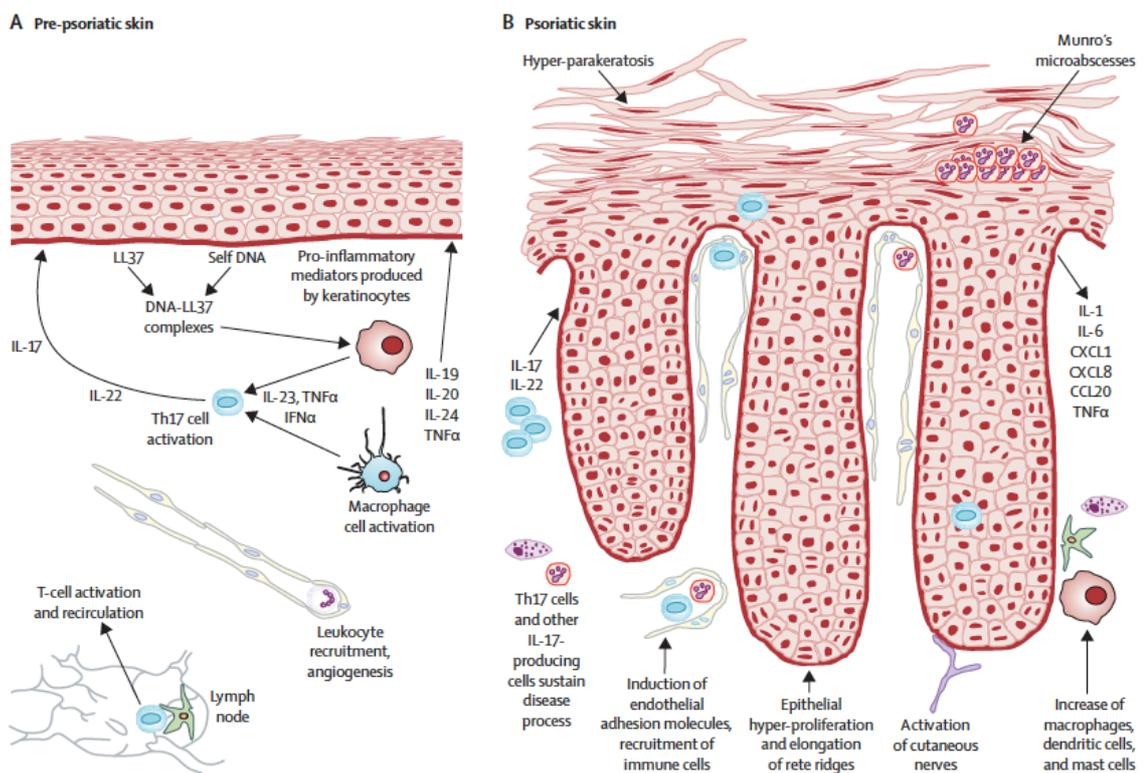
**Abbildung 3: Histopathologische Vorgänge der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [8])**

Im Vergleich zur nicht-läsionaler Haut (a) fällt bei Psoriasis-Erkrankten eine Akanthose mit dadurch sichtbar werdenden Reteleisten, eine Hyperkeratose und eine Parakeratose auf. An den Papillenspitzen sind Gefäßerweiterungen sichtbar sowie ein proinflammatorisches Milieu. Zusätzlich zeichnet sich die Dermis durch eine Papillomatose, Neoangiogenese und vermehrte Leukozyteninfiltrate aus (b).

## 1.2.5 Pathogenese

Bei der Psoriasis läuft der Zellumsatz der Epidermis innerhalb von 5 Tagen im Vergleich zu 28 Tagen bei gesunder Haut beschleunigt ab. Es kommt zu überschießender Proliferation der Keratinozyten bei gleichzeitig aberranter Differenzierung [1]. Die epidermale Homöostase, das engmaschig kontrollierte Gleichgewicht zwischen kontrollierter Proliferation in der Basalschicht und suprabasaler Stratifizierung ist somit gestört, sodass keine funktionsfähige und schützende Hautbarriere ausgebildet werden kann [22].

Die genaue Pathogenese der Psoriasis ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird derzeit vermutet, dass wie oben beschrieben, spezielle Triggerfaktoren wie Medikamente, Traumata und Infektionen sowie eine gestörte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 zu einer stetigen Induktion von plasmacytoiden dendritischen Zellen führen (Abb. 4).



**Abbildung 4: Immunpathogenese der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors aus [8])**

Durch endogene und exogene Trigger wird eine Signalkaskade ausgelöst. Komplexe aus Selbst-DNA und LL-37 aktivieren dermale dendritische Zellen, was die Ausreifung von naiven T-Zellen vor allem zu TH17-Zellen induziert. Durch verschiedene Mediatoren kommt es zur Aktivierung und Proliferation der Keratinozyten, welche in einem „Teufelskreis“ weitere proinflammatorische Zytokine bilden, was zu einer überschießenden Immunantwort führt.

Selbst-DNA und LL-37, ein antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Cathelicidine, welches von der Epidermis produziert wird, bilden Komplexe und stimulieren plasmazytoide dendritische Zellen, welche Interferon- $\alpha$  produzieren. Während unter gesunden Voraussetzungen dieser Ablauf zuständig für die Abwehrregulierung von Infektionen in verletzter Epidermis ist, kommt es unter pathologischen Bedingungen zur Reifung myeloider dendritischer Zellen, wodurch IL-12 und IL-23 sezerniert und die Differenzierung von T-Zellen in Effektorzellen wie TH17-Zellen und TH1-Zellen induziert wird. Diese produzieren wiederum IL-22, IL-17A und IL-17F, welche Keratinozyten aktivieren.

So aktivierte Keratinozyten sekretieren wiederum weitere proinflammatorische Chemokine und Zytokine, wodurch Entzündungszellen aus dem Gefäßsystem rekrutiert werden und infolgedessen ein Teufelskreis aus überschießender Immunantwort, epidermaler Verdickung und Neoangiogenese in Gang gesetzt wird [8,23].

Ursache der epidermalen Verdickung ist somit die gesteigerte Keratinozytenproliferation ausgelöst durch erhöhte mitotische Aktivität in der Basalschicht. K5 und K14 (Keratine der basalen Keratinozyten in gesunder Haut) reichen bei läsionaler Haut bis ins Stratum spinosum, während K1 und K10 (Keratine der suprabasalen Zellen in gesunder Haut) reduziert exprimiert sind. K6 und K16, welche mit Hyperproliferation assoziiert werden, sind verstärkt exprimiert. Darüber hinaus sind mehrere Marker der späten Keratinozytendifferenzierung wie Filaggrin, Loricrin und Caspase-14 herunterreguliert. Stattdessen sind Marker der frühen Keratinozytendifferenzierung wie Involucrin hochreguliert, bzw. werden vorzeitig exprimiert und reichen über mehrere epidermale Schichten [21,24].

### 1.2.6 Therapie

Die Therapieoptionen richten sich nach dem Schweregrad der Erkrankungen. Eine Basistherapie wird jedoch unabhängig von der Schwere empfohlen. Hierbei handelt es sich um die topische Gabe wirkstofffreier Salben und harnstoff- oder salizylsäurehaltiger Lokalthérapeutika zur Schuppenentfernung (Keratolyse). Erst nach Erreichen der entzündeten Haut folgt die darauffolgende Behandlung, die auf eine antiproliferative und antiinflammatorische Wirkung abzielt.

Eine topische Therapie wird überwiegend Patienten mit leichter Psoriasis angeraten, gegebenenfalls auch bei mittlerer und schwerer Form der Erkrankung. Dithranol, eines der ältesten topischen Lokalthérapeutika, welches stationären Patienten verabreicht wird, kann ein hoher Therapieerfolg zugeschrieben werden. Glukokortikosteroide zeigen ebenfalls gute Erfolge. Verwendet werden Kortikoide der Klasse III und IV. Um

eine Follikulitis oder Hautatrophie zu verhindern, ist ein Ausschleichen nach Wirkungseintritt erstrebenswert [2,12]. Die Kombination mit einem Vitamin-D-Derivat (Calcipotriol) zeigt eine gute Wirksamkeit [25].

Bei mittelschweren bis schweren Formen der Psoriasis mit flächigem Hautbefall kommen zusätzlich Phototherapien zum Einsatz. Bei Nichtansprechen dieser Methoden, wird eine systemische Therapie herangezogen. Dazu gehören Acitretin, Fumarsäure und Immunsuppressiva wie Methotrexat und Ciclosporin A.

Sollte es auch hier keinen Therapieerfolg geben bzw. eine Unverträglichkeit oder Kontraindikation vorliegen, können Biologika (Antikörper, Zytokine und Fusionsproteine) eingesetzt werden. Die gentechnologisch hergestellten Proteine blockieren relevante Rezeptoren und Zytokine und beeinflussen somit spezifisch Pathomechanismen. Dazu gehören nach der S3-Therapieleitlinie (2017): TNF- $\alpha$ -Blocker (Etanercept, Infliximab, Adalimumab), IL-12 und IL-23 Antagonisten (Ustekinumab) und ein IL-17A-Inhibitor (Secukinumab) [12,26]. Des Weiteren stehen seit kurzem die Gruppe der „small molecule inhibitors“ zur Verfügung. Apremilast, ein Inhibitor der Phosphodiesterase-4 (PDE-4) führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und dadurch zur verminderten Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-17 und IL-13. Außerdem kommt es zur Ausschüttung des anti-inflammatorischen IL-10 [27]. Tofacitinib, ist ein Janus-Kinase-Inhibitor (JAK), welcher die heterodimeren Rezeptoren aus JAK-1 und JAK-3 hemmt. Dadurch kommt es zur Inhibition des JAK-STAT-Signalwegs, über den inflammatorische Signale die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine regulieren. Tofacitinib ist zur Behandlung mittelschwerer bis schwerer Psoriasis-Arthritis zugelassen [28–30]. Außerdem laufen gegenwärtig Studien zum JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib, welcher zur topischen Behandlung milder bis moderater Psoriasis getestet wird [31].

Darüber hinaus wird gegebenenfalls eine Klimatherapie oder begleitend eine psychosoziale Therapie mit Schulungsprogramm angeraten [26].

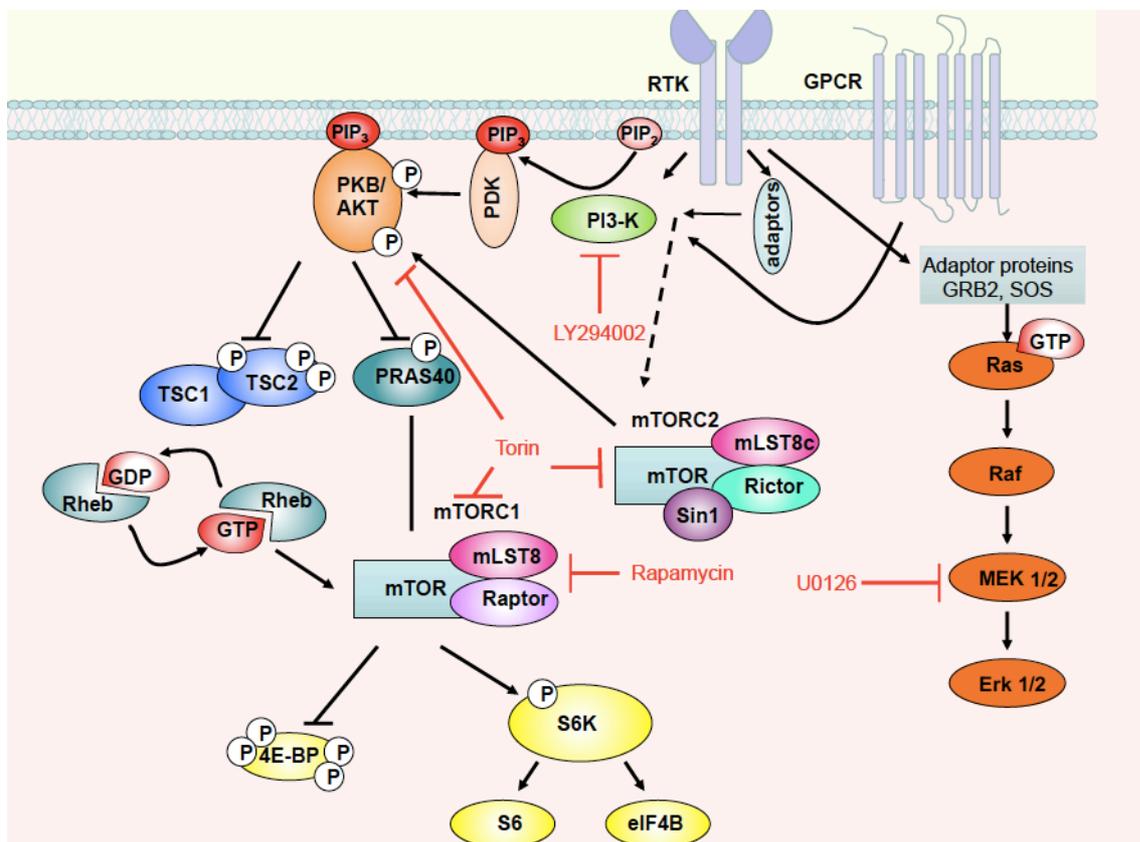
### 1.3 Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg und seine Funktion in der epidermalen Homöostase

#### 1.3.1 Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg

Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg stellt einen zentralen Signalleitungsweg in eukaryotischen Zellen dar (Abb. 5). Durch Bindung von spezifischen Liganden an Rezeptortyrosinkinase-Rezeptoren wie den EGF- oder den Insulinrezeptor wird die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) direkt oder über Adaptor-Proteine wie das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) oder das Src-homologe-Domäne-2-Protein (SHC)

aktiviert. Daraufhin wird das membrangebundene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert. Die Serin/Threonin-Kinase PKB/Akt und die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) binden an der Plasmamembran an PIP<sub>3</sub>. PDK1 phosphoryliert daraufhin PKB/Akt an Threonin 308 (T308). Des Weiteren phosphoryliert mTORC2 Akt an Serin 473 (S473), sodass Akt vollständig phosphoryliert ist [32]. Wird eine der beiden Bindungsstelle phosphoryliert, kommt es anschließend zur Phosphorylierung der Anderen [33]. LY294002 ist ein starker, nicht ausschließlich selektiver Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase im PI3-K/Akt-Signalweg [34].

Durch Phosphorylierung von diversen Signalmolekülen spielt PKB/Akt eine fundamentale Rolle, indem es zelluläre Prozesse wie Proliferation, Wachstum, Stoffwechsel oder Apoptose reguliert [32,35,36].



**Abbildung 5: Die PI3-K/Akt/mTOR-Signalkaskade (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [37])**

Nach Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wird PIP<sub>2</sub> durch PI3-K zu PIP<sub>3</sub> phosphoryliert, wodurch Akt rekrutiert und an T308 durch PDK1 bzw. an S473 durch mTORC2 phosphoryliert wird. Akt hemmt TSC2 durch Phosphorylierung. Dadurch kann TSC1/2 nicht an Rheb binden, was zur Aktivierung von mTORC1 führt. Dieser hat Einfluss auf verschiedene nachgeschaltete Proteine wie S6K und 4E-BP1. Außerdem wird durch Wachstumsfaktoren der MAPK-

Signaltransduktionsweg induziert. Dieser beginnt mit Adapterproteinen wie GRB2 und SOS, wodurch Ras, Raf, MEK1/2 und schließlich ERK1/2 aktiviert werden.

mTOR (mechanistic target of rapamycin) Komplex-1 (mTORC1) stellt einen weiteren relevanten Effektor dar und kontrolliert vor allem das zelluläre Wachstums [38–40]. PKB/Akt aktiviert mTORC1 durch Phosphorylierung von TSC2. Der Tuberous-Sclerosis-Complex (TSC 1/2) ist als Regulator von mTORC1 verantwortlich für die Verarbeitung der verschiedenen extrazellulären Signale [38,41]. TSC ist ein heterotrimerer Komplex bestehend aus TSC1, TSC2 und TBC1D7, welcher als GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Rheb fungiert. Durch Phosphorylierung von TSC durch Kinasen wie Akt, ERK, p90rsk, AMPK, IKK $\beta$  [41] dissoziiert der Komplex vom Lysosom, sodass TSC2 nicht mehr in der Lage ist als GTPase aktivierendes Protein für Rheb zu wirken [42]. Damit verbleibt Rheb im GTP-gebundenen Zustand, aktiviert mTORC1 und rekrutiert es an die lysosomale Membran [38,40,41,43–45]. Außerdem kann PKB/Akt über die Phosphorylierung von PRAS40 mTORC1 aktivieren, da dadurch die hemmende Wirkung von PRAS40 auf mTORC1 aufgehoben wird [46]. Der mTOR Komplex (mTORC1), welcher aus der mTOR-Kinase selbst, Raptor, PRAS40 und anderen regulatorischen Proteinen zusammengesetzt ist, phosphoryliert Effektormoleküle wie das 4E-Binding-Protein-1 (4E-BP) und die S6-Kinase-1 (S6K1), welche das ribosomale Protein S6 durch Phosphorylierung von Serin-235/6 aktiviert. 4E-BP1 und S6 sind beteiligt an der Proteinbiosynthese durch Translationsregulierung. Außerdem aktiviert mTORC1 weitere Transkriptionsfaktoren und fördert somit, neben der Proteinbiosynthese, die Lipidbiosynthese und unterdrückt Autophagie [39,46–49]. mTORC1 spielt also durch die Hemmung katabolischer Prozesse und die Stimulation anabolischer Prozesse eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation [38].

Neben mTORC1 liegt noch ein weiterer mTOR-Komplex vor: Der mTORC2 Komplex, bestehend aus der Kinase mTOR und weiteren akzessorischen Proteinen, phosphoryliert PKB/Akt an S473. Außerdem phosphoryliert er andere AGC-Kinasen, trägt zur zytoskelettalen Reorganisation bei und ist an der Zellinnendruckregulierung beteiligt [39,48,50,51]. Rapamycin und Torin1 sind Inhibitoren dieser mTOR-Komplexe. Während Rapamycin selektiv nur an den mTORC1 bindet und diesen hemmen kann, blockiert der ATP-kompetitive Inhibitor Torin1 sowohl mTORC1 als auch mTORC2 und hemmt damit zusätzlich den PKB/Akt-Signalweg [52,53]. Bei längerer Behandlung kann Rapamycin in einigen Zelltypen allerdings auch beide Komplexe hemmen [54]. Neben dem PI3-K-Signalweg wird durch Rezeptortyrosinkinase-Rezeptoren auch der Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Signaltransduktionsweg induziert. Dieser

startet über die Aktivierung des Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenen-Proteins-2 (GRB2) und des Guanosin-5-triphosphat-gebundenen Austauschfaktors Son-of-Sevenless (SOS). Daraufhin wird das Ratten-Sarkom-Protein (RAS) aktiviert, was in einer Phosphorylierungskaskade dann zur Aktivierung von RAF und MEK führt. Schließlich kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von p42/44 MAPK/ERK1, welche Gentranskription, Proteinsynthese, Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung reguliert [55]. U0126 ist ein selektiver MEK-Inhibitor. Da ERK1 auch zur Aktivierung von S6 beitragen kann, führt U0126-Behandlung auch zur Hemmung dieser Kaskade [56,57].

### 1.3.2 Die Rolle des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Regulation der epidermalen Homöostase

Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg ist in der Regulation der epidermalen Homöostase und in der Psoriasis-Pathogenese von großer Bedeutung. Unter gesunden Bedingungen ist PKB/Akt zuständig für das Aufrechterhalten des Gleichgewichts zwischen Keratinozytenproliferation und -differenzierung [58]. PI3-K und Akt sind im Frühstadium der Keratinozytendifferenzierung aktiviert und schützen vor verfrühtem Zelltod. Somit wird ein Wachstumsstopp und Differenzierung von Keratinozyten gefördert. Wird PI3-K inhibiert, induziert dies eine frühzeitige Apoptose der Zellen [59]. In suprabasalen Schichten scheint Akt-Aktivität für die Degradation von Lamin A/C verantwortlich zu sein, was Voraussetzung für die nukleäre Degradation und die terminale Differenzierung ist. Gestörte Akt-Aktivität trägt somit zu einer Parakeratose bei [60]. Der Akt/mTOR-Signalweg steuert außerdem Autophagie, welche im Stratum granulosum eine große Rolle im Prozess der terminalen Differenzierung spielt. Da in suprabasalen Schichten mTOR ausgeschaltet ist, kann durch Akt1 die Autophagie als Teil des Differenzierungsprozesses stattfinden. Gezeigt wird dies durch eine verstärkte Expression des Autophagiemarkers Autophagosome-associated-protein-light-chain-3 (LC3) [60].

Daneben spielt mTOR eine entscheidende Rolle in der epidermalen Morphogenese und Barrierefunktion. Ein Fehlen von mTOR während der Embryonalentwicklung resultiert in einer gestörten Stratifizierung. Die Barriestörung zeichnet sich zum einen durch die fehlende Fähigkeit Wasser in der Epidermis zu halten und zum anderen durch eine fehlende Schutzfunktion nach außen hin aus, wodurch die Überlebensrate von Keratinozyten negativ beeinflusst wird [61]. Darüberhinaus spielt der MAPK-

Signaltransduktionsweg ebenfalls eine Rolle in der epidermalen terminalen Keratinozytendifferenzierung und dessen Inhibition führt zu einer Barrierestörung [62].

### 1.3.3 Die Rolle des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Psoriasis-Pathogenese

In psoriatischer Haut ist der PI3-K/mTOR-Signalweg in Keratinozyten massiv hyperaktiviert und trägt durch Störung des Gleichgewichts zwischen Keratinozytenproliferation und -differenzierung zur Pathogenese bei [58,63,64].

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aktivieren den PI3K-Signalweg, wodurch es zur Aktivierung von PKB/Akt kommt [58]. Zudem kommt es in läsionaler Haut zur starken Aktivierung der mTOR-Kinase, PRAS40 und der nachgeschalteten Signalmoleküle wie 4E-BP1 und S6 [48]. Während mTOR in der gesamten Epidermis vor allem im Stratum basale aktiviert ist, zeigt S6 Hyperaktivität in suprabasalen Schichten [64].

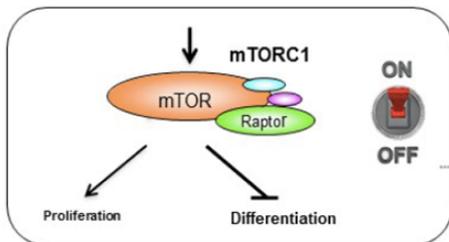
Die Hyperaktivierung des Signalwegs in basalen Schichten führt zu einer verstärkten Proliferation, während dessen Hyperaktivierung in suprabasalen Schichten für eine aberrante Differenzierung verantwortlich zu sein scheint [37]. In läsionaler Haut ist Akt in allen epidermalen Schichten aktiviert. Grund hierfür könnte sein, dass bei psoriatischen Keratinozyten proliferative Wege weiter eingeschaltet bleiben und Akt die zelluläre Apoptose hemmt, wodurch eine schnelle Reifung der Keratinozyten gefördert wird [37]. Lediglich gesunde Keratinozyten des Stratum basale weisen mTOR Aktivität auf, die mit Proliferationsaktivität verbunden zu sein scheint [61]. Beim Übergang von der Proliferations- in die Differenzierungsphase wird der mTOR-Signalweg normalerweise abgeschaltet, was geordnete Differenzierung erlaubt [48] (Abb. 6a, 6b). Im Gegensatz dazu kommt es unter entzündlichen Bedingungen wie in der Psoriasis durch inflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-17A und TNF- $\alpha$ ) zur Hyperaktivierung von mTOR mittels des PI3-K/Akt-Signalwegs. Dadurch wird verstärkt Proliferation induziert und geordnete Differenzierung inhibiert (Abb. 6c) [48]. mTOR spielt dementsprechend eine Rolle in epidermalen Veränderungen, welche zum psoriatischen Phänotyp beitragen. Interessanterweise scheint IL-22 mTOR nicht nur zu aktivieren, sondern induziert lediglich dessen Expression [65].

Akinduro et al. berichteten, dass Autophagie in der Epidermis konstitutiv auftritt und zum Kernabbau (Nukleophagie) während der Keratinozytenverhornung beiträgt. Sie zeigten auch, dass die bei der Psoriasis typische Kernretention in verhornten Schichten (Parakeratose) mit einer gestörten Autophagie korreliert. Hyperaktivierung

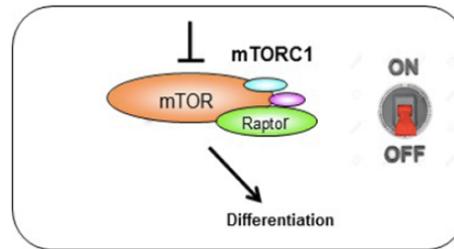
von mTORC1 hemmt diese Prozesse und trägt damit auch hier zu einer gestörten Differenzierung bei [66].

Die PI3-K/Akt/mTOR-Kaskade spielt darüber hinaus durch Regulation von Immunzellen eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis und kontrolliert deren Funktion und Differenzierung [37,48,58,59,64].

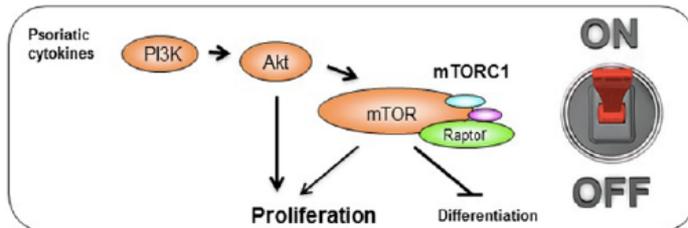
a) Stratum basale in gesunder Haut



b) Suprabasale Schichten in gesunder Haut



c) Keratinozyten psoriatischer Haut



**Abbildung 6: Regulation durch mTOR (mit Genehmigung des Autors aus [48])**

Im Stratum basale in gesunder Haut kommt es über den aktivierten mTOR-Signalweg zur Proliferation der Keratinozyten, während die Differenzierung gehemmt wird (a). Sobald die Zellen die Proliferation verlassen, wird der mTOR-Signalweg ausgeschaltet und Differenzierung induziert (b). Unter entzündlichen Bedingungen wie in der Psoriasis wird der Signalweg chronisch aktiviert, wodurch es zur vermehrten Proliferation bei gestörter Differenzierung kommt (c).

Zusammenfassend wird deutlich, dass durch eine erhöhte Aktivität von mTORC1 der Übergang vom proliferativen Zustand zur Differenzierung gestört wird, in suprabasalen Schichten der Prozess der Keratinozytenreifeung also nicht mehr stattfinden kann, sondern es zu einer vermehrten Proliferation durch Akt kommt [48].

#### 1.4 Die Rolle der IL-17 Zytokinfamilie in der Psoriasis-Pathogenese

Zytokine sind regulatorische Proteine die von zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten produziert werden und sowohl autokrin, parakrin als auch endokrin wirken können. Sie steuern Zellen des Immunsystems, regulieren entzündliche Prozesse und haben Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen [67].

In der IL-17 Zytokinfamilie wurde IL-17A als Erstes identifiziert [68]. Es spielt unter anderem bei der Entstehung von Autoimmunität, Tumoren, Entzündungsreaktionen und bei der Wirtsabwehr gegen Bakterien- und Pilzinfektionen eine Rolle [69]. Zudem ist IL-17A in zahlreichen Autoimmunerkrankungen wie in der Psoriasis hochreguliert [70–73]. IL-17A, welches von TH17-Zellen sekretiert wird, aktiviert Keratinozyten und induziert die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene [74,75].

Fünf weitere Isoformen sind bisher bekannt: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (= IL-25) und IL-17F. IL-17F teilt die höchste Homologie mit IL-17A (55%) und wird oft zusammen mit IL-17A exprimiert. IL-17B, IL-17D und IL-17C teilen eine Sequenzhomologie von 23-29%. Es handelt sich bis auf A und F, welche auch Heterodimere formen können, um Disulfid-gekoppelte Homodimere [76].

Die IL-17-Zytokine binden an heterodimere Rezeptoren, welche unter anderem von Keratinozyten exprimiert werden. Sie sind aus unterschiedlichen Rezeptoruntereinheiten zusammengesetzt. Während IL-17RA ubiquitär vorkommt, vermittelt die zweite Rezeptoruntereinheit die Spezifität. IL-17A und IL-17F binden an den Rezeptorkomplex bestehend aus IL-17RA und IL-17RC, IL-17E bindet an IL-17RA und IL-17RB [77,78]. Bindet IL-17A an IL-17RA führt dies zur Rekrutierung von Act1. Act1 vermittelt die Ubiquitinierung von TRAF6, woraufhin der NFκB-Signalweg aktiviert wird. Außerdem werden C/EBP Proteine und der MAPK-Signalweg aktiviert. IL-17A induziert somit entzündliche Prozesse, indem es zur Verstärkung der TNF-α Effekte kommt und der NFκB-Signalweg aktiviert wird [76,78–80].

Die Zytokine der IL-17-Familie spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Psoriasis. Im Verlauf der Pathogenese kommt es zur Sekretion von IL-23 durch dermale dendritische Zellen, was die Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17-Zellen induziert. Diese Lymphozyten produzieren IL-17A und IL-22 [81–83]. Außerdem tragen Mastzellen und neutrophile Granulozyten zur Produktion von IL-17A bei [68,84]. IL-17A führt zu einer erhöhten Proliferation und aberranten Differenzierung von Keratinozyten, indem es beispielsweise Filaggrin herunterreguliert und durch eine verstärkte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen die Neutrophilen/TH17-abhängige Immunantwort verstärkt [76,85]. In läsionaler psoriatischer Haut ist die Menge an IL-17F ebenfalls erhöht [71,86,87]. Auch IL-17C ist in läsionaler Haut vermehrt aufzufinden [76]. IL-17B und IL-17D sind dagegen in befallener psoriatischer Haut weniger nachweisbar als nicht-läsionaler Haut [71].

Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Psoriasis führten zu enormen Fortschritten in der Therapie der Psoriasis. Mehrere neue Medikamente, welche auf den IL-17-Signalweg abzielen sind heute zugelassen bzw. sind in Entwicklung [76]. So ist IL-17A

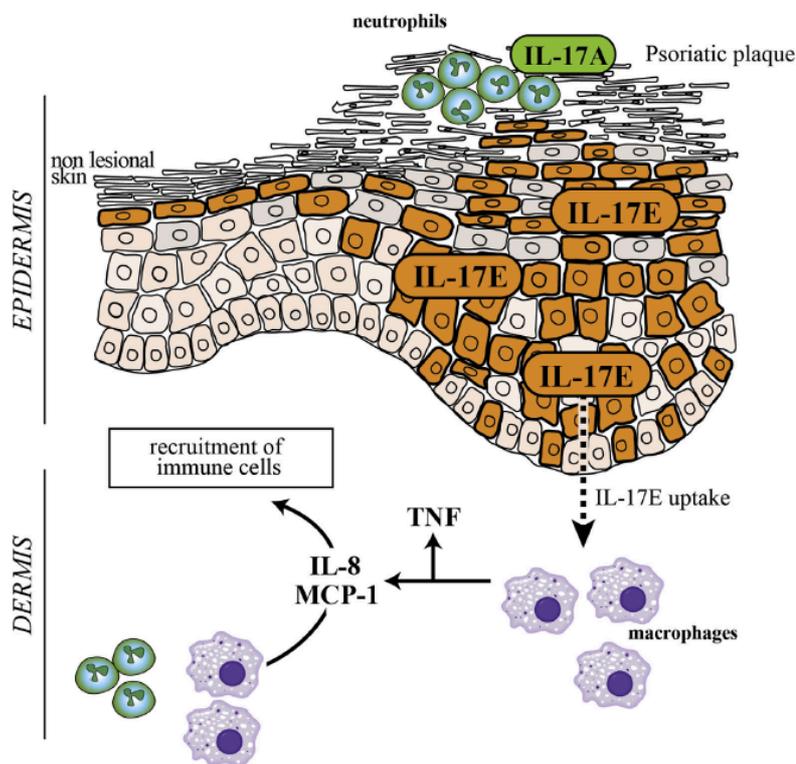
das Target verschiedener therapeutischer monoklonaler Antikörper. Der Vorreiter Secukinumab, ein humaner monoklonaler IgG1 $\kappa$ -Antikörper, welcher IL-17A-spezifisch bindet und diesen neutralisiert, ist seit 2015 als First-Line-Therapie zur Behandlung mittelschwerer bis schwerer Psoriasis zugelassen. Ixekizumab ist ein IL-17A-bindender humanisierter, monoklonaler IgG-4-Antikörper [78]. Brodalumab hingegen hemmt nicht das Zytokin, sondern bindet spezifisch an dessen Rezeptor. Er erkennt IL-17RA und blockiert somit die Bindung von IL-17A, IL-17F, IL-17C und IL-17E, welche ebenfalls an IL-17RA binden [78]. Wird dieser Rezeptor gehemmt, kommt es zur klinischen Besserung der psoriatischen Symptome, was darauf hindeutet, dass auch andere IL-17-Isoformen eine Rolle bei der Pathogenese spielen [68,88]. Es wird sogar vermutet, dass eine IL-17RA-Inhibition effektiver ist als eine IL-17A-Hemmung, da IL-17A, IL-17F, IL-17C und IL-17E eine ähnliche proinflammatorische Funktion im Rahmen der Psoriasis spielen [76]. Patienten, welche jedoch mit Secukinumab behandelt werden, weisen im Vergleich weniger unerwünschte Nebenwirkungen auf. Der Grund könnte hierfür sein, dass Secukinumab nicht IL-17F hemmt und IL-17F-Homodimere vor opportunistischen Infektionen schützen [78]. IL-17F und IL-17C wirken nämlich schützend im Hinblick auf Darmentzündungen. Es ist daher noch nicht geklärt, welche und ob Nebenwirkungen oder Risiken bei der Inhibition von IL-17F und IL-17C durch Brodalumab auftreten [76]. Weiterhin ist ein dualer IL-17A/F-Hemmer, Bimekizumab, ein humanisierter monoklonaler IgG1-Antikörper in der Entwicklung [89].

### 1.5 Die Rolle von IL-17E in der Psoriasis-Pathogenese

IL-17E, auch bekannt als IL-25, ist interessanterweise das abweichendste Mitglied der IL-17-Familie mit einer Sequenzhomologie von nur 16% [76], sodass von einer divergenten Funktion ausgegangen wird. IL-17E wird von Epithelzellen, Endothelzellen und anderen Immunzellen wie T-Zellen, eosinophilen Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet [90,91]. Es wird als Disulfid gebundenes Homodimer sekretiert und bindet an einen heterodimeren Rezeptor bestehend aus IL-17RA und IL-17RB [77,92]. Es wurde zunächst den TH2-Zytokinen zugeordnet, welche bei TH2-vermittelten Erkrankungen wie Allergien oder der Atopischen Dermatitis (AD) eine Rolle spielen [69], da eine Überexpression in atopischer Haut gefunden wurde [93], wo es die Expression von Filaggrin negativ beeinflusst und damit zur Zerstörung der epidermalen Barriere beiträgt [94]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in psoriatischer Haut IL-17E von Keratinozyten in großen Mengen produziert wird, sogar mehr als IL-17A. Das sekretierte IL-17E wird durch clathrin-abhängige Endozytose von Makrophagen aufgenommen, wodurch diese

aktiviert werden. In Folge dessen kommt es zu deren Aktivierung und Entwicklung zu und M1-Makrophagen, welche Zytokine und Chemokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-8 und CCL20 sekretieren, was zur Neutrophilenrekrutierung und damit zur Verstärkung der Entzündung führt (Abb. 7) [68].

Die Menge von IL-17E in läSIONALER Haut korreliert infolgedessen mit der Menge an Neutrophilen und ist umgekehrt proportional zur Zahl an eingewanderten T-Zellen, was darauf hindeutet, dass es potentiell eine Rolle in der Chemotaxis spielt [68]. Ferner führt ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im IL-17E-Gen zu einem noch schwereren Ausmaß bei psoriatischer Arthritis [95].



**Abbildung 7: Der Einfluss von IL-17E in der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors aus [68])**

Keratinozyten bilden in psoriatischer Haut verstärkt IL-17E, welches von Makrophagen aufgenommen wird, wodurch diese aktiviert werden und TNF- $\alpha$ , IL-8 und MCP-1 produzieren. Dies resultiert in einer verstärkten Entzündungsreaktion durch Rekrutierung weiterer Immunzellen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

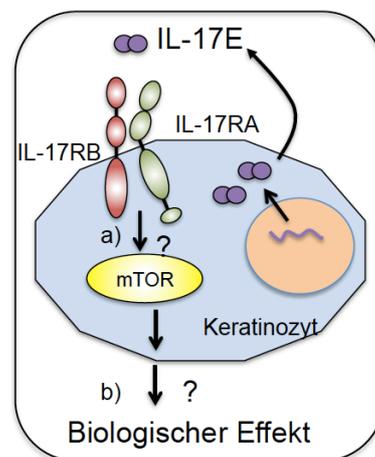
Im Hinblick auf die Psoriasis konnte bereits gezeigt werden, dass von TH17-Zellen ausgeschüttete Zytokine, insbesondere die der IL-17-Familie, eine große Rolle in der Pathogenese spielen. Diese Zytokine binden an von Keratinozyten exprimierte heterodimere Rezeptoren, was zu verstärkter Keratinozytenproliferation und aberranter Differenzierung führt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl IL-17E-produzierender Keratinozyten in der Epidermis psoriatischer Läsionen höher ist als die der IL-17A-Zellen [74,77,96]. IL-17E spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Makrophagen und ist folglich mitverantwortlich für Entzündungs- und Autoimmunreaktionen [96]. Da aber auch Keratinozyten beide Untereinheiten des IL-17E-Rezeptors [97] (IL-17RA + IL-17RB) exprimieren [98], ist auch ein autokriner Effekt auf Keratinozyten denkbar. Diese Annahme, dass IL-17E eine Rolle unabhängig von Immunzellen hat, wird dadurch unterstützt, dass IL-17E in Mäusen einen Psoriasis-ähnlichen Phänotyp induziert [99]. Während die nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden der IL-17RA-Rezeptor-Untereinheit vor allem für IL-17A, welcher an ein Dimer aus IL-17RA und IL-17RC bindet, gut beschrieben sind [69], fehlen genauere Hinweise zu Signalwegen, die durch die Kombination mit IL-17RB aktiviert werden und damit Spezifität in der IL-17E-Signalleitung vermitteln [97]. Außerdem ist bisher nicht bekannt, welche biologischen Effekte in Keratinozyten durch IL-17E vermittelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, inwiefern IL-17E ebenfalls einen Effekt auf Keratinozyten hat und damit zur psoriatischen Entzündung beiträgt und welche intrazellulären Signalkaskaden aktiviert werden. Im Besonderen sollte der Effekt auf Signalwege untersucht werden, welche eine Rolle in der Psoriasis-Pathogenese spielen.

Im Detail sollten daher für diese Arbeit folgende Ziele verfolgt werden (Abb. 8):

- a) die intrazellulären Signaltransduktionswege in Keratinozyten zu identifizieren, welche durch IL-17E aktiviert werden und
- b) den biologischen Effekt von IL-17E auf Keratinozyten zu untersuchen.



**Abbildung 8: Aufklärung der Wirkung von IL-17E auf Keratinozyten**

Ergebnisse aus dieser Arbeit sollten dementsprechend nicht nur Erkenntnisse zur Rolle von IL-17E im Rahmen der Psoriasis-Pathogenese liefern, sondern auch Hinweise geben, ob auch die IL-17E-Kaskade in der Epidermis ein Target für die Psoriasis-Therapie darstellen kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte und Software

**Tabelle 1: Übersicht zu den verwendeten Geräten mit Angabe des Herstellers**

Technische Geräte und Software	Hersteller
Ausgießstation (Leica EG 1150H, Kühlplatte Leica EG 1150C)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Autostainer XL	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Beheizte Pinzette (Leica EG F)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Entwässerungsautomat „ASP 200S“	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Eppendorf Thermostat Block Heater	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Flockeneisbereiter	Scotsman Ice System, Vernon Hills, IL, USA
ImageJ Grafiksoftware	Wayne Rasband, NIH, USA
iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Laborspülmaschine	Miele, Gütersloh, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CKX41	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank BioWizard Golden GL-200 Klasse II	Kojair, Vilppula, Finnland
Mikrozentrifuge	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Mini-PROTEAN® Gel System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Plattformschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rotationsmikrotom (Leica RM 2165)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Vortex Mixer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wärme- und Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, gekühlt	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Übersicht zu den verwendeten Materialien mit Angabe des Herstellers**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
5, 10, 25ml Stripette, Costar	Corning Inc., Corning, NY, USA
Blotting Paper 3mm	GE Healthcare Europe GmbH, Breisgau, Deutschland
Combitips advanced® 0.5, 5.0ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Disposable Scalpel No.11	FEATHER Safety Razor Co., Japan
Einbettkassetten universal	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immobilon-P Transfermembran	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Multi®-SafeSeal® Tubes	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nunc EasYFlask 175cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas 230mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg Deutschland
Pipettenspitze 10/20µl, 200µl, 1250µl	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Röhrchen, 15, 50ml, Cellstar	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

ThinCert Zellkultur Einsatz	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zählkammer C-CHIP	NanoEnTek, Seoul, Südkorea
Zellkultur Multiwellplatte 6, 12, 24, 96 Well	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers**

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
10x Tris/glycine/SDS running buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> -Solution (0,5M)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CnT-Prime 3D Barrier Culture Medium	CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Schweiz
DetachKit (HEPES BSS, Trypsin/EDTA, TNS)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Dulbecco's phosphate-buffered saline DPBS (1X)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Ethanol (100%, 95%, 70%)	Apotheke
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formalin 4,5% phosphatgepuffert, säurefrei, pH7	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland;
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland;
Keratinocyte-Growth-Medium-2 (KGM-2)	PromoCell GmbH, Heidelberg,

	Deutschland
Methanol	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Paraplast Plus Tissue Embedding Medium	McCormick Scientific, St. Louis, Missouri, USA
Penicillin/Streptomycin (10µl/ml bzw. 10U/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Permanent AP-Red-Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
PMSF (0,1M = 100x in Isoprop)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RIPA Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Venlo, Niederlande
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Signal Stain	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Sodium chloride analytical reagent grade	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TEMED C6H16N2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma® base	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (100%)	Apotheke

#### 2.1.4 Zytokine

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Zytokine mit Artikelnummer und Hersteller

Zytokine	Artikelnummer	Hersteller
IFN $\gamma$	300-02	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
IL-17A	200-17	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
IL-17E	200-24	PeptoTech, Hamburg, Deutschland

IL-1 $\beta$	200-01	PeproTech, Hamburg, Deutschland
IL-22	200-22	PeproTech, Hamburg, Deutschland
IL-23	200-23	PeproTech, Hamburg, Deutschland
IL-4	200-04	PeproTech, Hamburg, Deutschland
TNF- $\alpha$	300-01A	PeproTech, Hamburg, Deutschland

### 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Antikörper mit Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller**

Antikörper	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
<b>Primärantikörper für Western Blot und Immunohistochemie</b>			
anti $\beta$ -Aktin Maus	1:100 000 (WB)	A1979	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-Cytokeratin 10 antibody [EP1607IHCY] Kaninchen	1:1000 (WB)	ab76318	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Involucrin IgG 1 clone [SY8] Maus	1:10 000 (WB) 1:2000 (IHC)	ab20202	Abcam, Cambridge, UK
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Kaninchen	1:1000 (WB)	4370	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Kaninchen	1:3000 (WB) 1:1500 (IHC)	2211	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
PKB/Akt (Ser473) Kaninchen	1:1000 (WB)	4060	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Filaggrin Kaninchen	1:600 (IHC)	905801	BioLegend, Inc., San Diego, USA
<b>Sekundärantikörper für Western Blot</b>			
Anti-mouse IgG, HRP-gekoppelter Antikörper	1:3000	7074	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelter Antikörper	1:3000	7076	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande

## 2.1.6 Chemischen Inhibitoren

**Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten chemischen Inhibitoren mit Konzentration, Artikelnummer und Hersteller**

Antikörper	eingesetzte Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
LY 294002 = 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, BRD2 Inhibitor IV, BRD3 Inhibitor III, BRD4 Inhibitor IV	0,05µM	440202	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Rapamycin = mTORC1 Inhibitor I	0,1µM	553211	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Torin = mTORC1 und 2 Inhibitor	0,25µM	4247	Tocris Bioscience, Bristol, UK
U0126 = MAP-Kinase-Kinase (MKK, MEK) Inhibitor	0,01µM	70970	Cayman Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

## 2.1.7 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer

**Tabelle 7: Übersicht der Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung**

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
1 x TBS-T	100ml 10x TBST in 900ml VE H <sub>2</sub> O mit 500µl Tween® 20
10 x TBS für 1L Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (Waschlösung)	0,2M Tris; 1,5M NaCl; 0,5% Tween® 20
10x Towbin Buffer (pH 8,3) (Transferpuffer)	25mM Tris; 192mM Glycin; 10% (v/v) Methanol
1x Laemmli Puffer	200ml 10x Laemmli; 1800ml VE H <sub>2</sub> O
1x Towbin Puffer	200ml 10x Towbin Puffer; 1500ml VE H <sub>2</sub> O; 200ml MeOH
4 x SDS Proteinladepuffer	240mM DTT; 8% SDS; 250mM Tris; 40% Glycerin; 0,4% Bromphenolblau
4 x Tris Puffer pH 6,8 (Sammelgel-Puffer) (Upper Tris)	500mM Tris; 0,4% SDS

4 x Tris Puffer pH 8,8 (Trenngel-Puffer) (Lower Tris)	1500mM Tris; 0,4% SDS
5x Laemmli Puffer (pH 8,5) (Laufpuffer)	25mM Tris; 250mM Glycin; 0,1% SDS
Blockierungslösung	5,0% Magermilchpulver in 1x TBST
BSA-Lösung	5,0% BSA; 0,01% NaN <sub>3</sub> in 1x TBST
Entkalkungslösung	6,45% Formalin; 2% HCL; 6,85% Ameisensäure in Aqua dest.
RIPA	500µl 10x RIPA, 50µl PMSF in 5ml Millipore H <sub>2</sub> O

### 2.1.8 Zellen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit der spontan immortalisierten humanen Zelllinie HaCaT (human adult low calcium temperature keratinocytes) gearbeitet. HaCaT ist die erste beständige epitheliale Zelllinie erwachsener humaner Haut, welche eine vollständige epidermale Differenzierung zeigt. Der Name HaCaT (= Human adult low Calcium high Temperature) leitet sich von den ursprünglichen Wachstumsbedingungen ab, nämlich einer niedrigen Calciumionenkonzentration von 0,2mM und einer hohen Umgebungstemperatur von 38,5°C. Die Zelllinie stammt von der wenig sonnenexponierten Hälfte des Rückens eines 62-jährigen männlichen Patienten, welche keine malignen Zellen aufweist. Sie ist zwar bis über 140 Passagen unsterblich und besitzt einen transformierten Phänotyp, verhält sich jedoch nicht Tumor-induzierend. Differenzierungsspezifische Keratine (Keratin-1 und 10) und andere Marker (Involucrin, Filaggrin) werden exprimiert. Daher ist sie zur Untersuchung von zellbiologischen Vorgängen geeignet und weist keine individuellen Unterschiede, wie sie bei primären Keratinozyten zu finden sind, auf [100]. Zu Vergleichs- und Gegenüberstellungszwecken wurden die Versuche ebenfalls mit primären normalen humanen Keratinozyten (NHK) verschiedener Donoren durchgeführt. NHK-Zellen wurden aus humaner juveniler Vorhaut isoliert und in einem Keratinocyte-Growth-Medium-2 (KGM-2) kultiviert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

HaCaT-Zellen wurden in DMEM GlutaMAX Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. NHK-Zellen wurden in Keratinocyte-Growth-Medium-2 (KGM-2) kultiviert. Sämtliche Versuche wurden unter Sterilbänken mit sterilen Materialien durchgeführt. Die Zellkultivierung erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen mit Filterdeckel bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 100% Luftfeuchtigkeit.

Vor Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen gesplittet bzw. für Versuche ausgesät. Das alte Medium wurde abgesaugt und mit DPBS bei HaCaT oder HBSS bei NHK gespült. Als Nächstes wurde EDTA für 1min auf die HaCaT-Zellen gegeben. EDTA chelatiert  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ , sodass die Ionen den adhäsionsvermittelten Adhäsionsmolekülen wie Integrinen nicht mehr zur Verfügung stehen und die Zelladhäsion an der Kulturplatte vermindert wird. Nach dem Entfernen wurde Trypsin/EDTA (HaCaT: Trypsin 0,25%/ EDTA 0,1%; NHK: DetachKit) hinzugegeben und im Brutschrank für 5min inkubiert. Trypsin zerstört durch Spaltung der Peptidbindung zwischen Lysin und Arginin die Zelladhäsionsmoleküle. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei den primären Keratinozyten wurde das Ablösen der Zellen mit einem Trypsin-Inhibitor gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in 10ml Medium aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde 5min bei 1200Upm (22°C) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 10ml Medium hinzugefügt und resuspendiert. 10 $\mu$ l wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl gezählt. Die vier großen Eckquadrate der Kammer wurden ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgt nach folgender Gleichung: Zellen/ ml= Mittelwert x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup>.

Folgende Zellzahlen wurden zur Aussaat für Versuche in unterschiedlichen Kulturgefäßen ausgesät:

**Tabelle 8: Zellzahl und Mediumvolumina zur Aussaat bei Versuchen**

	HaCaT	NHK
6-Well-Multischale	5x 10 <sup>5</sup> Zellen/ 1ml	4x 10 <sup>5</sup> Zellen / 1ml
12-Well-Multischale	2x 10 <sup>5</sup> Zellen/ 1ml	2x 10 <sup>5</sup> Zellen/ 1ml
12-Well-Multischale (Differenzierungsversuch)	0,6x 10 <sup>5</sup> Zellen/ 1ml 6,0x 10 <sup>5</sup> Zellen/ 1ml	2x 10 <sup>5</sup> Zellen/ 1ml
96-Well-Mikrotiterplatten	0,3; 0,5; 1,0x 10 <sup>4</sup> Zellen/ 100 $\mu$ l	-

Diese Ansätze wurden jeweils über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag für den Versuch verwendet.

## 2.2.2 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

### Herstellung der Proteinlysate

Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen, 14µl RIPA pro cm<sup>2</sup> hinzugefügt und 20min auf Eis inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Um die Zellreste zu entfernen, wurden die Zellysate für 10min bei 13000Upm (4°C) zentrifugiert.

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford nach Herstellerprotokoll bestimmt. Dazu wurden 4µl mit 200µl Bradford-Lösung versetzt und die Absorption bei 595nm gemessen. Ein Mittelwert wurde aus der Doppelbestimmung ermittelt und ein Blank-Wert subtrahiert. Die Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich mit einer BSA-Standardreihe (0 bis 1,5mg/ml). Die Proben wurden durch Zugabe von 1x RIPA-Puffer auf die gleiche Proteinkonzentration normalisiert. Danach wurde 4x SDS Sample Buffer hinzugefügt, um schließlich auf eine 1x Konzentration zu gelangen.

### Proteinauftrennung mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Page ist ein Polyacrylamid-Gelelektrophorese System zur Proteinauftrennung entsprechend des Molekulargewichts in einem elektrischen Feld.

Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) im 4x SDS Sample Buffer dient der Denaturierung. Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine gehen verloren. Zusätzlich überdeckt es die Eigenladung aller Proteine, sodass die Proteine eine negative Ladung entsprechend ihres Molekulargewichts erhalten. Dadurch wird eine Auftrennung nach ihrer Größe möglich. Die Proben in SDS-Ladepuffer wurden für 4min bei 94°C aufgekocht, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu zerstören. Die normierten Proteinproben wurden in die Taschen des Gels gefüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde der Proteingrößenmarker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Fisher (8µl/ Tasche) verwendet.

Als Laufpuffer wurde 1x Laemmli Buffer benutzt. Die Gelelektrophorese im Mini-Protean® Tetra System erfolgte für 45min bei 200V bis die Lauffront am Ende des Gels sichtbar war.

### Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) übertragen. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert. Gel und Membran wurden

luftblasenfrei aufeinander gelegt, um sie dann zwischen zwei Whatman-Gel-Blotting-Papiere und zwei Blotting-Schwämme zu legen.

In die Blotting-Kammer mit Towbin-Transferpuffer kam zusätzlich ein mit Eis gefüllter Einsatz um einer Überhitzung vorzubeugen. Der Transfer erfolgte bei 100V für 60min.

#### Waschen und Blocken der Membran

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in 5% Milchpulver-Lösung (in 1x TBST) für 30min inkubiert, um die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen, die nicht von Antikörpern erkannt werden zu blockieren.

Danach wurde die Membran in die Primärantikörper-Lösungen gegeben.

#### Detektion von Proteinen mittels Primär- und Sekundärantikörpern

Die Primärantikörper-Lösung wurde in 5% BSA in einem 50ml Falcon Tube angesetzt (Tabelle 5), die Membran eingelegt und über Nacht bei 4°C auf einen Rolltisch inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein 3x 5-minütiges Waschen in 1x TBST. Anschließend wurden die Membranen in ein zweites Falcon Tube mit dem Sekundärantikörper für 60min gelegt. Dieser Sekundärantikörper bindet aufgrund des Speziesunterschiedes im Fc-Teil des Antikörpers an den Primärantikörper. Der HRP- (horseradish peroxidase) konjugierte-Sekundärantikörper erzeugt in Verbindung mit spezifischen Chemilumineszenz-Substraten Licht, sodass sie Proteinbanden sichtbar gemacht werden können. Dazu werden die Membranen mit der Entwicklerlösung Clarity Western ECL Substrat versetzt. Pro Membran wurden hierzu 500µl Reagenz Peroxide und 500µl Reagenz Luminol verwendet. Nach der Inkubation für 5min erfolgte die Detektion lichtemittierender Banden mittels des Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System mit Image Lab™ Software.

#### „Strippen“ von PVDF-Membranen

Um einen Nachweis mit einem anderen Antikörper zu ermöglichen, war ein „Strippen“ der Membran nötig. Die Membran wurde in 1x TBST gewaschen und für 5min in den Stripping-Buffer gelegt. Nach erneutem Waschen erfolgte ein Blocken in 5% Milchpulver. Daraufhin wurde die Membran erneut im Primärantikörper inkubiert.

#### Densitometrische Auswertung des Western Blots

Die densitometrische Auswertung der Blotting-Membranen erfolgte mittels Image Lab Software 6.0.1. Die Intensität der Banden der phosphorylierten Proteine wurde auf die Intensität einer Ladekontrolle normiert.

### 2.2.3 Differenzierungsversuch von Keratinozyten in zweidimensionaler Kultur

Bei HaCaT-Zellen erfolgte die Einleitung der Differenzierung durch konfluentes Wachstum. Dazu wurden  $6 \times 10^5$  Zellen/ 12 Well ausgesät, um eine Differenzierung der Zellen anzuregen. Als Kontrolle wurden  $0,6 \times 10^5$  Zellen ausgesät, um unter diesen Bedingungen weiterhin zu proliferieren.

In primären normalen humanen Keratinozyten (NHK) erfolgte die Induktion der Differenzierung durch Zugabe von 2mM  $\text{CaCl}_2$ . Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/ 12 Well ausgesät und nach 24h mit  $\text{CaCl}_2$  (2mM) versetzt. Die Ernte erfolgte nach 72h oder 144h.

### 2.2.4 Analyse der Zellproliferation mittels WST

Für die Proliferationsassays wurde der Farbstoff WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) verwendet, um die Anzahl der viablen Zellen zu bestimmen. Bei lebensfähigen Zellen, welche eine intakte Atmungskette besitzen, wird das Tetrazolinium-Salz durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolinium-Reduktase zum Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoff gespalten. Unter Verwendung eines Spektralphotometers wird die Absorption des Farbstoffes gemessen und ausgewertet (450nm). Die Farbintensität ist somit proportional zur Anzahl lebender Zellen und wird durch Vergleich mit unbehandelten Zellen als indirektes Maß für den proliferationsfördernden Effekt von Zytokinen verwendet [101].

Die einzelnen Schritte in Aufbau und Durchführung verliefen nach Angaben des Herstellers.  $1 \times 10^4$  Zellen pro 100 $\mu\text{l}$  Well in 96-Well-Mikrotiterplatten wurden in Fünffachbestimmung ausgesät. Wells, die nur Medium enthielten, dienten als Blank-Wert. Die Behandlung erfolgte gemäß der Versuchsbeschreibung. Zur Messung der Proliferation wurden 10 $\mu\text{l}$  WST hinzugegeben und nach 4h bei 37°C die Absorption bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 595nm gemessen. Die Messwerte der Referenzwellenlänge werden von den 450nm Werten subtrahiert. Anschließend wurde der Blankwert subtrahiert und die Werte auf die Kontrolle normalisiert.

### 2.2.5 Herstellung eines dreidimensionalen Epidermismodells

In den ThinCert Zellkultur-Membraneinsatz wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in CnT-Prime ausgesät und in 12-Well-Platten mit je 1ml Prime-Medium gegeben. Nach 24 Stunden fand ein Mediumwechsel im Membraneinsatz statt. An Tag 4 wurde das Medium auf 3D-Barrier-Medium gewechselt. An Tag 5 wurde das Hautmodell in „Deepwell“-Platten

an die „Air-Liquid-Interface“ (ALI) angehoben, wodurch die Versorgung der Keratinozyten nur noch von unten über die Matrix stattfindet und Differenzierung und Stratifizierung induziert wird. Gleichzeitig wurde die Stimulation der Zellen mit den entsprechenden Zytokinen durchgeführt.

An Tag 8, 10, 12 fand ein Mediumwechsel statt sowie eine erneute Zugabe der Zytokine. An Tag 15 erfolgte die Ernte. Die Hälfte der Membran wurde für histologische Querschnitte des dreidimensionalen Epidermismodells verwendet und in 4% Formalin fixiert. Die restliche Membran wurde zur Herstellung von Proteinlysaten verwendet. Hierbei wurden die Zellen mit 100µl RIPA von der Membran herunter pipettiert. Nach 20min Inkubation wurden die Proben für 10min bei 13000Upm (4°C) zentrifugiert.

## 2.2.6 Histologie und immunhistologische Färbung

Zur Untersuchung des Effekts von IL-17E im dreidimensionalen Epidermismodell wurden histologische und immunhistologische Färbungen durchgeführt.

### Probenvorbereitung

Die fixierten Membranen wurden in Einbettkassetten überführt und in einem Entwässerungsautomaten „ASP 200S“ entwässert. Dieser unterzieht die Proben der folgenden Alkoholreihe (Formalin, Ethanol 70%, Ethanol 96% , Isopropanol, Ethanol absolut, Xylol, Paraffin Wax). Im Anschluss wurden die Proben aus der Einbettkassette entnommen und in einen Paraffinblock eingebettet, um aus diesem Paraffinschnitte anzufertigen zu können.

### Paraffinschnitte

Der Paraffinblock wurde zum Durchkühlen auf eine -16°C vorgekühlten Kühlplatte gelegt. Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt. In einem Wasserbad wurden die Proben bei 40°C zum Strecken überführt und auf Objektträger gezogen. Als Nächstes wurden die Schnitte für 15min bei 60°C getrocknet, um bei Raumtemperatur gelagert werden zu können.

### Entparaffinieren und Rehydrieren nach Färbung

Die Paraffinschnitte wurden als Vorbereitung für histologische und immunhistologische Färbungen 3x je 6min in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe (100% Isopropanol, 100% Isopropanol, 96% Ethanol, VE H<sub>2</sub>O, je 90s) rehydriert.

### Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung dient zur Übersicht für morphologische Untersuchungen. Mit der Hämalaulösung nach Mayer werden alle Strukturen, die sauer bzw. basophil sind, wie Zellkerne dunkelblau gefärbt. Alle anderen Gewebestrukturen, die basisch bzw. azidophil sind, wie Zytoplasmaproteine werden rötlich gefärbt. Die Durchführung der HE-Färbung erfolgte nach Herstellervorgaben der Firma Leica Autostainer XL. Die entparaffinierten Schnitte wurden 10min mit Hämatoxylin-Färbelösung gefärbt, 3min mit destilliertem Wasser gespült, 2s in HCL/Alkohol (1%) gehalten, 4min mit destilliertem Wasser gespült, 4min in Ethanol getaucht (96%) und anschließend 30s in einer alkoholischen Eosinfärbelösung inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (96% 30s, 96% 60s, 100% 90s, 100% 90s), 2min in Xylol inkubiert und anschließend mittels Entellan eingedeckelt.

Die epidermale Dicke wurde mittels ImageJ an drei verschiedenen Stellen pro Schnitt gemessen und der Mittelwert berechnet.

### Immunhistologie

Mittels immunhistologischer Färbungen (IHC) wurden Differenzierungsmarker und Signalmoleküle mit spezifischen Primärantikörpern angefärbt.

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte entparaffiniert. Zunächst wurden sie 3x 5min in Xylol, 2x 3min in Isopropanol, 1x 3min in 96% Ethanol, 1x 3min in 70% Ethanol und 1x 5min in destilliertes Wasser gelegt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 20min in Citrat Puffer bzw. in EDTA bei 95°C hitzebehandelt, um die Antikörperbindungsstellen zu demaskieren. Nach der Demaskierung wurden die Schnitte nochmals 1x 5min in destilliertem Wasser und 1x 5min in TBS gewaschen. Darauffolgend wurden die Schnitte mit den entsprechenden Primärantikörpern bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2x 5min in TBS gewaschen und zur Behandlung mit Sekundärantikörper 30min mit Histofine Simple Stain AP inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang 1x 5min in TBS folgte eine bis zu 20-minütige Inkubation mit der Substratlösung (Permanent AP-Red-Kit). Danach wurden die Schnitte für 2min in destilliertes Wasser gelegt, für 2min mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt und für 3min in Leitungswasser gebläut. Daraufhin folgte die Inkubation in einer aufsteigende Alkoholreihe: 2min in 96% Ethanol, 2min in 96% Ethanol, 2min in Isopropanol, 2min in Isopropanol, 2min in Xylol und 2min in Xylol. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt. Die Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Olympus CKX41) in 10 und 20-facher Vergrößerung mikroskopiert.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mittels zweiseitigem bzw. einseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test mittels der GraphPad Prism Software (Version 7, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Werte der Kontrollproben auf 1 normiert und alle weiteren Proben hiermit verglichen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn  $*p < 0,05$  war.

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit sollte sein, einen potentiellen autokrinen Effekt von IL-17E auf Keratinozyten zu untersuchen und die dadurch aktivierten Signalkaskaden sowie die durch IL-17E-vermittelten biologischen Effekte zu identifizieren.

#### 3.1 Untersuchung IL-17E-induzierter Signaltransduktionskaskaden in Keratinozyten

HaCaT- und NHK-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen IL-17E behandelt und die Aktivierung des PI3-K/Akt/mTOR- sowie des MAPK-Signalwegs untersucht (Abb. 9). Als Positivkontrolle wurden Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A und IL-22 eingesetzt, die ebenfalls eine Rolle in der Psoriasis-Pathogenese spielen und die genannten Signalwege aktivieren. Die Wirkung von IL-17E wurde sowohl alleine als auch in Kombination mit anderen typischen inflammationsfördernden Zytokinen untersucht, um Bedingungen zu schaffen, die der *in vivo* Situation näher kommen und zu analysieren, ob es eventuell zu einer Wirkverstärkung kommt. In HaCaT-Zellen induziert IL-17E eine deutliche Phosphorylierung von Akt, S6 und ERK1, wobei eine dosisabhängige Steigerung beobachtet werden konnte (Abb. 9a). Die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A führte in HaCaT-Zellen, wie bereits zuvor gezeigt werden konnte, zu einer deutlichen dosisabhängigen Aktivierung von Akt [48]. Hingegen führen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aber nicht IL-17A zu einer deutlichen Aktivität von mTORC1/S6 sowie des MAPK-Wegs. Die Kombination von IL-17E mit IL-22 hat keinen additiven Effekt auf die Aktivität von Akt, S6 und ERK1. In primären NHK-Zellen hingegen induziert IL-17E (Abb. 9b) nur eine leichte Aktivierung von Akt, während es zur einer deutlichen dosisabhängigen Steigerung der Phosphorylierung von S6 und ERK1 kommt. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren eine schwache Aktivierung von Akt und ERK1. Ähnlich wie in HaCaT-Zellen verhalten sich TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-17A in Bezug auf mTORC1 mit einer starken Aktivierung von S6. Wie in den HaCaT-Zellen hat die Kombination von IL-17E mit IL-22 in NHK-Zellen keinen additiven Effekt auf ERK und S6.

Die densitometrische Auswertung mehrerer gleich durchgeführter Versuche bestätigt in HaCaT-Zellen die deutliche Induktion von mTORC1 durch IL-17E um das 13-fache sowie eine leichte Aktivierung von Akt um das 1,7-fache und ERK um das 1,6-fache. Im Vergleich zu IL-17A ist die Aktivierung durch IL-17E sichtbar höher (Abb. 9c). In den NHK-Zellen ist eine insgesamt schwächere Aktivierung von Akt, mTOR und ERK durch IL-17E zu erkennen. Auch der Effekt der übrigen Zytokine fällt schwächer aus (Abb. 9d).

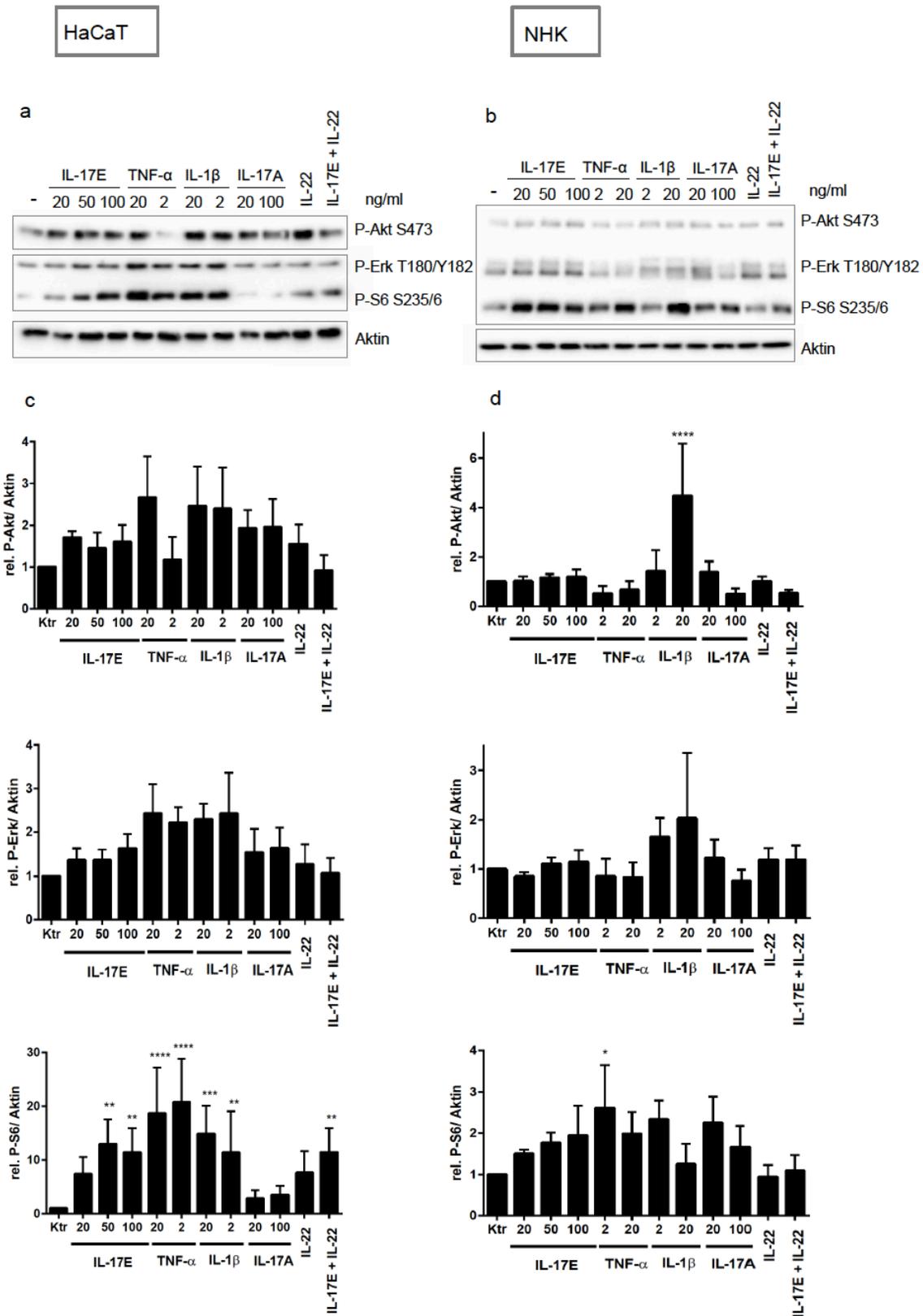


Abbildung 9: IL-17E induziert in Keratinozyten die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 über den PI3-K/Akt- und den MAPK-Signalweg

HaCaT- (a) bzw. NHK- (b) Zellen wurden nach Kultivierung in Mangelmedium mit den gezeigten Zytokinen für 30min behandelt (IL-17E 20-100ng/ml, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  je 2-20ng/ml, IL-17A 20-100ng/ml, IL-22 20ng/ml, IL-17E 100ng/ml + IL-22 20ng/ml). Zellysate wurden hergestellt, welche mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, durch Western Blotting auf Membranen übertragen und die gezeigten Proteine mit entsprechenden Antikörpern visualisiert wurden. (c+d) Densitometrische Auswertung von n= 3-5 gleich durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test berechnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\* p  $\leq$  0,01, \*\*\*p  $\leq$  0,001, \*\*\*\*p  $\leq$  0,0001).

Um die Signalwege exakt zu bestimmen, mittels derer IL-17E in der Lage ist eine Aktivität des ribosomalen Proteins S6 und ERK1 zu induzieren, wurden verschiedene Inhibitoren spezifisch für Komponenten der PI3-K/Akt/mTOR-Kaskade und des MAPK/ERK1-Signalwegs eingesetzt. Dazu wurden HaCaT- und NHK-Zellen erneut mit IL-17E stimuliert und zusätzlich mit den chemischen Inhibitoren LY294002, Rapamycin, Torin und U0126 vorbehandelt. Als Positivkontrolle wurden erneut TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-22 und ein Mix aus IL-22 und IL-17E verwendet.

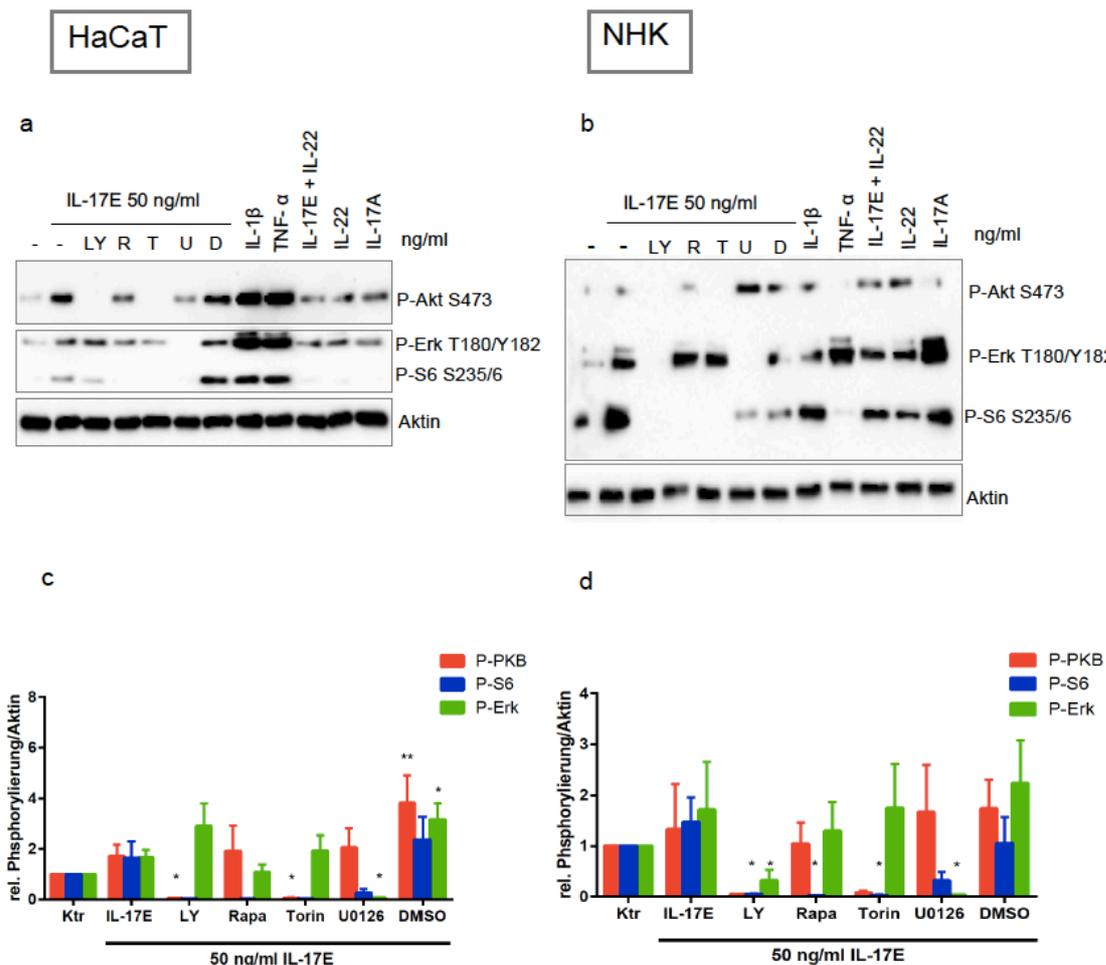
Bei Behandlung der Zellen allein mit IL-17E ist, wie bereits gezeigt, sowohl in HaCaT- und als auch bei NHK-Zellen, eine deutliche Aktivierung von Akt, ERK und S6 zu beobachten (Abb. 10a und 10b).

In Gegenwart des PI3-K-Inhibitor LY294002 kann IL-17E keine Aktivierung von Akt oder S6 mehr induzieren, was zeigt, dass die IL-17E-abhängige Aktivierung des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs über PI3-K vermittelt wird. Interessanterweise bewirkt LY294002 teilweise auch eine Inhibition von ERK. Rapamycin blockiert ebenfalls die IL-17E-abhängige Phosphorylierung von S6, was auf eine Beteiligung von mTORC1 hinweist. Torin hingegen inhibiert sowohl mTORC1 als auch mTORC2, sodass keine IL-17E-induzierte Aktivität von Akt und S6 gemessen werden konnte (Abb. 10a und 10b). Der MEK-Inhibitor U0126 induziert einerseits eine Erniedrigung der IL-17E-induzierten ERK-Phosphorylierung, aber auch der S6-Phosphorylierung im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollprobe ohne U0126. Dies zeigt, dass die IL-17E-abhängige Aktivierung von mTOR neben dem PI3-K/Akt-Pathway auch über den MEK/ERK-Signalweg vermittelt wird.

TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führen in HaCaT-Zellen erneut zu einer deutlichen Aktivierung von Akt, ERK und S6 (Abb. 10a), während IL-17A, IL-22 und der Mix aus IL-22 und IL-17E eine etwas schwächere Aktivierung als zuvor induzieren (Abb. 9a). Im Gegensatz dazu führt in NHK-Zellen IL-17A zu einer starken Aktivierung von ERK und S6, während TNF- $\alpha$  nur ERK deutlich aktivieren kann. Auch IL-22 und der Mix aus IL-22 und IL-17E verursachen eine deutlichere Aktivierung des Akt, ERK und S6-Signals.

Die densitometrische Auswertung mehrerer gleich durchgeführter Versuche bestätigt erneut die klare Induktion von Akt, ERK und S6 durch IL-17E. Der Einsatz der Inhibitoren bestätigt in HaCaT-Zellen die Abhängigkeit von den gehemmten Signalmolekülen.

In NHK-Zellen ist ein ähnliches Muster zu erkennen. Anders als in den HaCaT-Zellen führt LY294002 jedoch auch zu einer Erniedrigung der IL-17E-induzierten ERK-Phosphorylierung (Abb. 10c+d).



**Abbildung 10: IL-17E induziert in Kertinozyten die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 über den PI3-K/Akt- und den MAPK-Signalweg**

(a+b) HaCaT- (a) bzw. NHK- (b) Zellen wurden nach Kultivierung in Mangelmedium zunächst für 30min mit den Inhibitoren (LY: LY294002, 0,05µM; R: Rapamycin, 0,1µM; T: Torin, 0,25µM; U: U0126, 0,01µM; D: DMSO Lösungsmittelkontrolle) behandelt und anschließend 30min mit den gezeigten Zytokinen stimuliert (IL-17E 50ng/ml, IL-1β 20ng/ml, TNF-α 2ng/ml, IL-17E 100ng/ml + IL-22 20ng/ml, IL-22 20ng/ml, IL-17a 50ng/ml, bei NHK IL-17E 50ng/ml + IL-22 20ng/ml, IL-17A 20ng/ml). Zelllysate wurden hergestellt, welche mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, durch Western Blotting auf Membranen übertragen und die gezeigten Proteine mit entsprechenden Antikörpern visualisiert wurden. (c+d) Densitometrische Auswertung von n= 5-9 gleich durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM. Die

statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test in Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen berechnet (\* $p \leq 0.05$ ).

### 3.2 Untersuchung der Wirkung von IL-17E auf die Proliferation von Keratinozyten

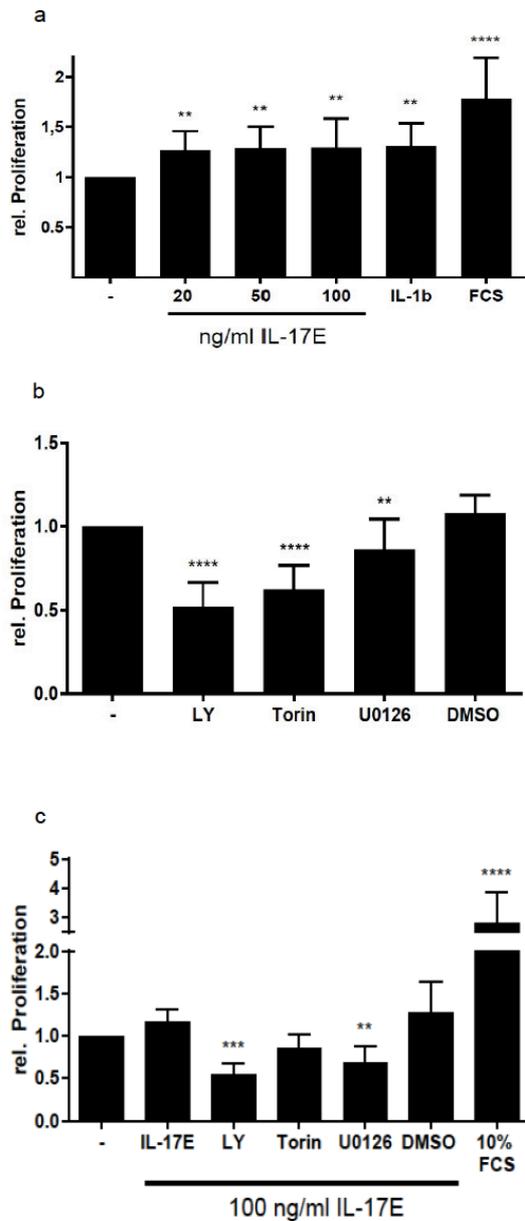
Im Rahmen der Psoriasis-Pathogenese kommt es zur verstärkten Proliferation von Keratinozyten, was über den PI3-K/Akt-Signalweg vermittelt wird. Aufgrund der Induktion dieses Signalwegs durch IL-17E wurde untersucht, ob IL-17E über diesen Signalweg einen proliferationsfördernden Effekt auf Keratinozyten hat.

Zunächst wurde der Effekt von IL-17E auf die Proliferationsrate der Keratinozyten mittels WST1-Proliferationsassays bestimmt. Es ist eine signifikante Induktion der Proliferation um ca. 20% durch IL-17E festzustellen, ähnliches ist mit IL-1 $\beta$  zu beobachten, für das zuvor ein proliferationsfördernder Effekt gezeigt werden konnte. Interessanterweise kann die Proliferationssteigerung bereits durch 20ng/ml IL-17E erreicht werden und auch höhere Dosen bewirken keine weitere Steigerung (Abb. 11a).

Auch wenn bereits bekannt ist, dass der PI3-K/Akt-Signalweg an der Proliferationskontrolle in Keratinozyten beteiligt ist, sollte in einem Vorversuch die Abhängigkeit von den hier untersuchten Signalwegen noch einmal dargestellt werden. HaCaT-Zellen wurden dazu in Nährmedium mit den Inhibitoren LY294002, Torin und U0126 behandelt. Durch Inhibition von PI3-K mittels LY294002 kommt es zu einem 50%igen Rückgang der Proliferation im Vergleich Kontrollzellen. Auch die Hemmung beider mTOR-Komplexe durch Torin induziert eine 40%ige Hemmung, während bei Inhibition des MAPK-Signalwegs durch U0126 die Proliferation lediglich um 15% reduziert ist (Abb. 11b). Somit konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden, dass vor allem der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg an der Proliferationskontrolle in Keratinozyten beteiligt ist.

Darauf aufbauend wurde der proliferationsinduzierende Effekt von IL-17E in Kombination mit den Inhibitoren untersucht (Abb. 11c). Auch hier führt die Behandlung mit IL-17E zu einer Steigerung der Proliferation um ca. 20%. Wurde zusätzlich LY294002, hinzugegeben, zeigt sich ein signifikant inhibitorischer Effekt um ca. 55% auf die IL-17E-abhängige Proliferation. Die Inhibition des MAPK-Signalwegs mittels U0126 hemmt die IL-17E-induzierte Proliferation deutlich schwächer. Mit Torin behandelte Zellen, zeigen lediglich einen Trend zum Rückgang der Proliferation um ca. 25%. Es wird dementsprechend bestätigt, dass auch die IL-17E-induzierte Proliferation über den PI3K/Akt- und ERK-Pathway vermittelt wird.

HaCaT



**Abbildung 11: IL-17E induziert Proliferation mittels des PI3-K/Akt-Signalwegs**

(a) 24h nach der Aussaat erfolgte das Aushungern der Zellen in Mangelmedium. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit IL-17E (20-100ng/ml) bzw. IL-1 $\beta$  (100ng/ml) stimuliert. Nach weiteren 48h wurde die Zellproliferation mittels WST-1-Assay ermittelt (n= 8). (b) 24h nach der Aussaat wurden die Zellen mit Inhibitoren behandelt (L: LY294002, 0,05 $\mu$ M; T: Torin, 0,25 $\mu$ M; U: U0126, 0,01 $\mu$ M; D: DMSO) und nach weiteren 48h die Zellproliferation mittels WST-1-Assay ermittelt (n= 12-18). (c) 24h nach der Aussaat erfolgte das Aushungern der Zellen in Mangelmedium. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit IL-17E (100ng/ml) stimuliert und mit den oben genannten Inhibitoren behandelt. Nach weiteren 48h wurde die Zellproliferation mittels WST-1-Assay ermittelt (n= 11-13). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit einseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test im Verhältnis zu

unbehandelten Zellen (a+b) bzw. mit IL-17E-behandelten Zellen (c) berechnet (\*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001, \*\*\*\*p ≤ 0,0001).

### 3.3 Untersuchung der Wirkung von IL-17E auf die Differenzierung von Keratinozyten in zweidimensionaler Kultur

Psoriatische Keratinozyten zeigen ein gestörtes Differenzierungsverhalten. Daher sollte untersucht werden, ob die aberrante Expression von IL-17E und die damit verbundene Aktivierung von Keratinozyten einen Einfluss auf deren Differenzierungsverhalten hat. Der Effekt von IL-17E wurde dazu mit anderen Zytokinen, die einen deutlichen Effekt auf die Keratinozytendifferenzierung im Rahmen der Psoriasis-Pathogenese haben, verglichen.

Zur Induktion der Differenzierung wurden HaCaT-Zellen (Abb. 12a) nahezu konfluent ausgesät (D). Durch postkonfluentes Wachstum kann dann Differenzierung induziert werden. Zellen, die weniger konfluent ausgesät wurden und noch proliferieren (P) zeigen nur eine schwache Expression von Involucrin (Inv) und Keratin-10 (K10). Für die Behandlung differenzierender Zellen (D) mit IL-17E wurde eine Konzentration von 50ng/ml gewählt, welche einen deutlichen Effekt auf die untersuchten Signalwege gezeigt und einen signifikanten Effekt auf die Proliferation hat.

IL-17E induziert in HaCaT-Zellen eine deutliche Expressionssteigerung von Keratin-10, während es einen geringeren Effekt auf die Expression von Involucrin hat. Stattdessen unterdrücken IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-4 und TNF- $\alpha$  die Expression der Differenzierungsmarker. IL-23 führt ebenfalls zur verstärkten Expression von Keratin-10 und gleichzeitig zur abgeschwächten Expression von Involucrin. Mit Kombinationen aus IL-17E- und IL-17A- bzw. IL-17E- und IL-22-behandelte HaCaT-Zellen exprimieren ebenfalls verstärkt Keratin-10 bei gleichbleibender Expression von Involucrin. Der Mix aus IL-17E und IFN- $\gamma$  hingegen führt interessanterweise zur Unterdrückung der beiden Differenzierungsmarker.

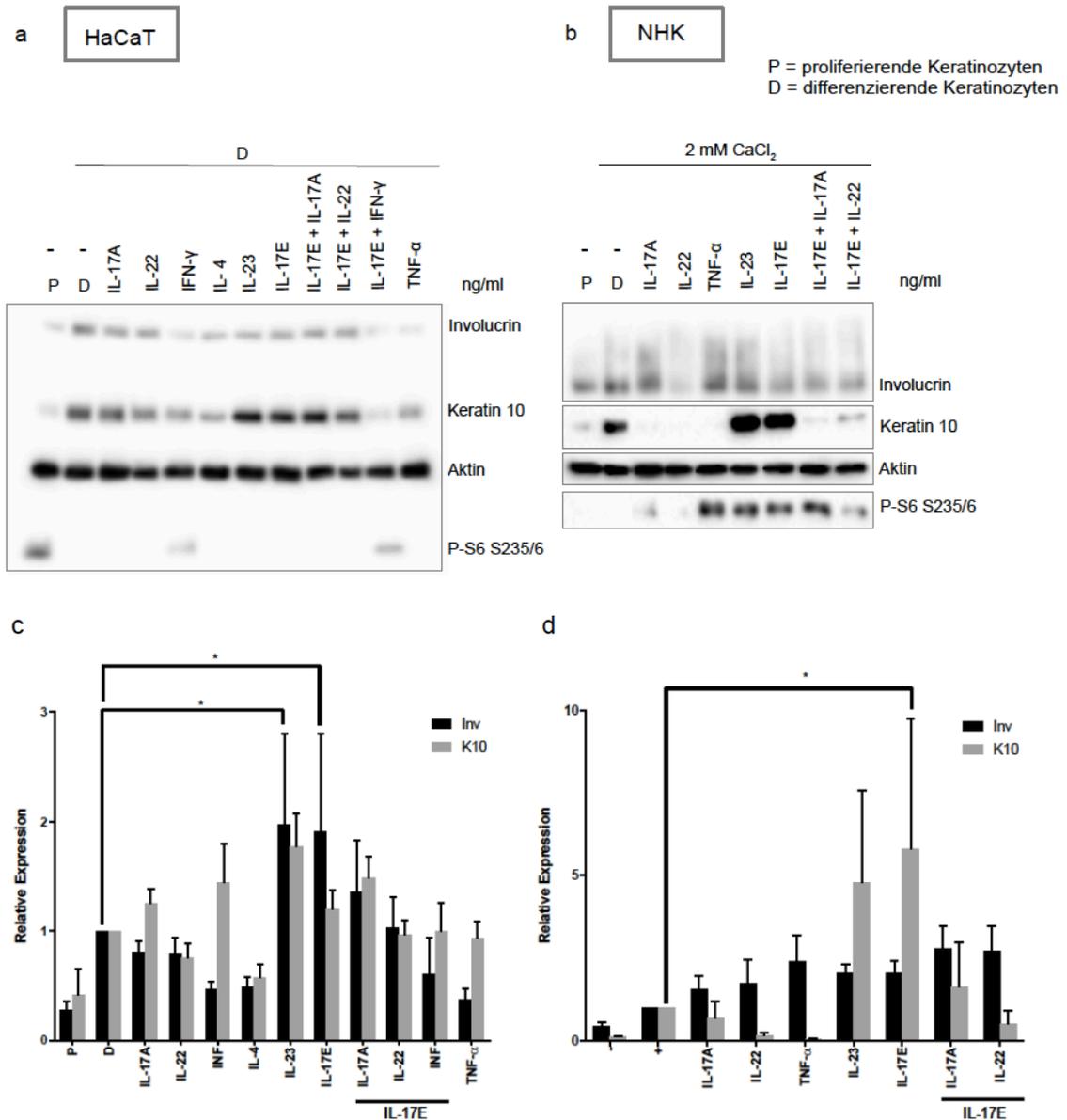
Der mTORC1-Signalweg wird bei Einleitung der Differenzierung wie beschrieben abgeschaltet, sodass eine Phosphorylierung von S6 nur in proliferierenden Zellen detektiert werden kann. Auch in Gegenwart von TNF- $\alpha$  oder IL-17E, die eine starke mTORC1-Aktivität induzieren (siehe Abb. 9), kann unter differenzierenden Bedingungen keine S6-Phosphorylierung mehr detektiert werden. Lediglich durch IFN- $\gamma$  und den Mix aus IL-17E und IFN- $\gamma$  ist eine leichte Aktivierung des mTOR-Signalwegs noch erkennbar.

Zum Vergleich wurde auch in NHK-Zellen (Abb. 12b) der Effekt von IL-17E auf die Differenzierung untersucht. Dazu wurden NHK-Zellen für 72h mit 2mM CaCl<sub>2</sub> behandelt. Bei gleichzeitiger IL-17E-Behandlung kommt es ähnlich wie in HaCaT zu

einer starken Expression von Keratin-10, jedoch zu einem geringeren Anstieg des Involucrin-Signals. IL-23 führt, ähnlich wie IL-17E, zur erhöhten Expression beider Differenzierungsmarker. IL-17A, IL-22 und TNF- $\alpha$  führen zur starken Unterdrückung der Keratin-10 Expression. Während IL-17A und TNF- $\alpha$  zu einer leichten Verstärkung des Involucrin-Signals führen, unterdrückt IL-22 das Signal. Auch der Mix aus IL-17E und IL-17A und der Mix aus IL-17E und IL-22 zeigen eine, wenn auch nicht ganz so starke, Unterdrückung der beiden Differenzierungsmarker. Die mTORC1-Aktivität kann in NHK-Zellen im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen trotz zunehmender Differenzierung durch einige Zytokine aufrechterhalten werden. Dies trifft vor allem auf IL-17E, den Mix aus IL-17E und IL-17A sowie TNF- $\alpha$  und IL-23 zu.

Die densitometrische Auswertung mehrerer gleich durchgeführter Versuche bestätigt in unbehandelten HaCaT- und NHK-Zellen eine deutliche Erhöhung der Differenzierungsmarker unter Differenzierungsbedingungen. Es ist eine Tendenz zur verstärkten Expression von Involucrin und K10 durch IL-17E sowie durch die Kombination mit IL-17A zu erkennen (Abb. 12c). In NHK-Zellen ist eine signifikante Expressionsteigerung von K10 durch IL-17E um das 6-fache zu erkennen sowie ein Trend zur erhöhten Expression von Involucrin durch IL-17E. Auch IL-23 führt zu einer erhöhten Signalstärke der Differenzierungsmarker (Abb. 12d).

In HaCaT-Zellen wird die Expression von Involucrin durch IL-23 um das 2-fache und durch IL-17E um das 1,9-fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gesteigert. Im Gegensatz dazu führen die anderen Zytokine zu einer Unterdrückung der Involucrin- und K10-Expression.



**Abbildung 12: IL-17E verstärkt die Expression von Keratin-10**

In HaCaT-Zellen (a) wurde Differenzierung durch postkonfluentes Wachstum induziert. In NHK-Zellen (b) wurde die Differenzierung durch Ca<sup>2+</sup>-Zugabe (2mM) induziert. Daraufhin wurde die Stimulation mit IL-17E (50ng/ml) und den gezeigten Zytokinen (je 20ng/ml) durchgeführt. Nach 72h wurden Zelllysate hergestellt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, durch Western Blotting auf Membranen übertragen und die gezeigten Proteine mit entsprechenden Antikörpern visualisiert. (c+d) Densitometrische Auswertung von n= 9-11 (a); n= 4-6 (b) gleich durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test berechnet (\*p ≤ 0.05).

### 3.4 Untersuchung der Wirkung von IL-17E in einem dreidimensionalen Epidermismodell

Um den Effekt auf die Differenzierung und epidermale Stratifizierung näher zu untersuchen, wurde IL-17E im Vergleich zu anderen psoriatischen Zytokinen auch in dreidimensionalen Epidermismodellen untersucht. Dazu wurden NHK-Zellen auf einer Membran ausgesät, die Zellen nach dem Anwachsen an die „Air-Liquid-Interface“ angehoben und mit Psoriasis-typischen Zytokinen behandelt. Nach 10 Tagen erhält man eine stratifizierte Epidermis, die für histologische Analysen und zur Herstellung von Proteinlysaten geerntet wird.

In der unbehandelten Kontrolle ist die typische Schichtung einer nativen Epidermis zu erkennen (Abb. 13a). IL-22 induziert eine signifikante Akanthose, also eine Verdickung vor allem des Stratum spinosum (Abb. 13c). IL-17E (Abb. 13f) führt jedoch weder alleine noch in Kombination mit IL-17A zu einer Veränderung der epidermalen Dicke (Abb. 13g). Insgesamt sind keine gravierenden morphologischen Unterschiede durch IL-17E-Behandlung erkennbar. Im Vergleich dazu induziert TNF- $\alpha$  eine Verdickung des Stratum granulosum (Abb. 13d). Die Kombination aus IL-17E und IL-22 führt zwar zu einer leichten Verdickung der Epidermisschicht, jedoch nicht im gleichen Maße wie IL-22 alleine (Abb. 13h). IL-17A und IL-23 führen zu einer histologisch unauffälligen Epidermis (Abb. 13b+e). Die Auswertung der epidermalen Dicke mehrerer gleich durchgeführter Experimente bestätigt die signifikante Akanthose durch IL-22 (Abb. 13i), während die übrigen Zytokine keinen signifikanten Einfluss auf die epidermale Dicke haben.

Zur näheren Analyse des Differenzierungsgrades wurden immunhistochemische Färbungen der Hautmodelle für verschiedene Differenzierungsmarker (Involucrin, Filaggrin) sowie für Signalmoleküle des mTOR-Signalwegs durchgeführt (Abb. 13j).

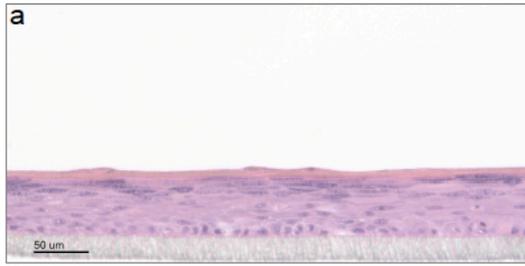
Die unbehandelte Kontrolle weist eine Expression der Differenzierungsmarker ähnlich zu nativer Haut auf. IL-17E-behandelte Proben zeigen wie in den unbehandelten Präparaten keine Involucrin-Färbung in der Basalschicht, während die Intensität der Färbung in den suprabasalen Schichten durch IL-17E zunimmt. Ähnliches ist mit IL-17A sowie bei der Kombination von IL-17E und IL-17A zu beobachten. Im Gegensatz dazu fällt die Intensität der Involucrin-Färbung durch IL-22 und die Kombination von IL-17E und IL-22 deutlich schwächer aus. In Filaggrin-gefärbten Schnitten ist im Vergleich zur Kontrolle, welche lediglich im Stratum granulosum eine Färbung aufzeigt, eine deutlich starke Hochregulation durch IL-17E zu erkennen, welche bis in basale Schichten reicht. Auch durch IL-17A ist das Ausmaß der Färbung stärker. Interessanterweise sind die Schnitte durch Kombination von IL-17E und IL-17A

schwächer gefärbt. Epidermismodelle, welche mit IL-22 behandelt wurden, zeigen nur eine sehr schwache Filaggrin-Färbung. Interessanterweise ist in der unbehandelten Kontrollprobe bereits eine starke mTORC1-Aktivität, gezeigt durch P-S6-Färbung, zu sehen. Lediglich die Basalschicht weist eine schwächere Färbung auf. Zytokin-behandelte Proben weisen im Gegensatz dazu eine weniger intensive oder ähnliche Färbung bei gleicher Verteilung auf; die Aktivität kann durch Zytokine somit nicht gesteigert werden. IL-22 und IL-17A scheinen sogar eine verminderte Aktivität hervorzurufen. Während es also in 2D-Versuchen zu einer deutlichen Aktivierung von S6 durch IL-17E kam, war im Hautmodell keine weitere Steigerung der Aktivität zu beobachten.

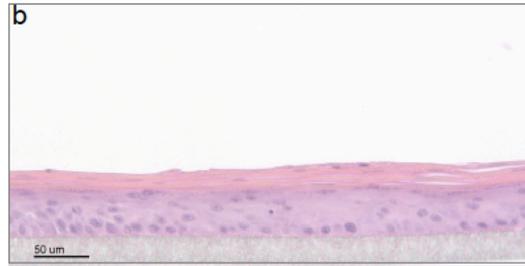
Auch mittels Western Blotting wurden die Differenzierungsmarker Involucrin und K10 sowie die mTORC1-Aktivität (P-S6 S235/6) näher betrachtet (Abb. 13k). IL-17E, TNF- $\alpha$  und IL-23 führen zu einer deutlichen Überexpression der beiden Differenzierungsmarker Involucrin und Keratin-10. IL-17E verhält sich also ähnlich wie in den immunhistochemischen Färbungen, in denen eine stärkere Färbung von Involucrin zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu fällt der Effekt von IL-17A und IL-22 alleine und in Kombination mit IL-17E schwächer aus (Abb. 13k), obwohl IL-17A in Kombination mit IL-17E in den immunhistochemischen Färbungen zu einer Hochregulation führt.

Im Western Blot zeigt sich erneut eine deutliche Induktion von S6 durch die Zytokine und zumindest auch schwach durch IL-17E. Daher ist anzunehmen, dass die hier angewandte immunhistochemische Färbung zu stark war, um die Änderungen der S6 Phosphorylierung zu detektieren.

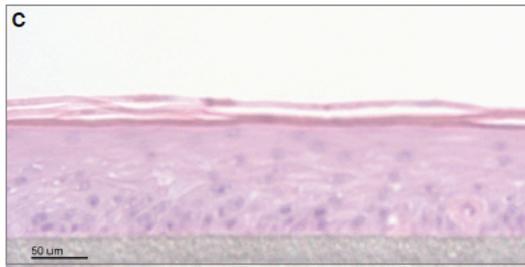
Die densitometrische Auswertung mehrerer gleich durchgeführter Versuche bestätigt, dass IL-17E eine signifikante Induktion von Involucrin um das 8-fache und Keratin-10 um das 7-fache auch im dreidimensionalen Epidermismodell induziert, während die anderen Zytokine und die Kombination mit IL-17E keinen durchgehend signifikanten Effekt auf die Expression der Differenzierungsmarker haben (Abb. 13 l+m).



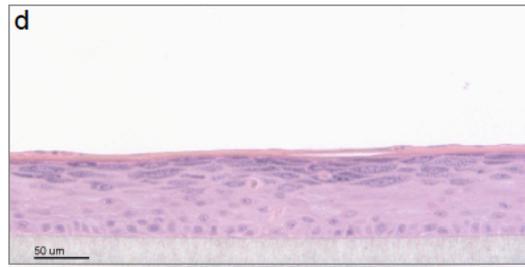
Kontrolle



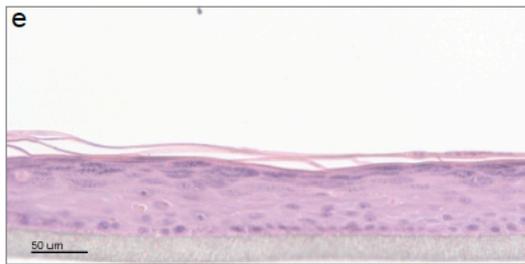
IL-17A



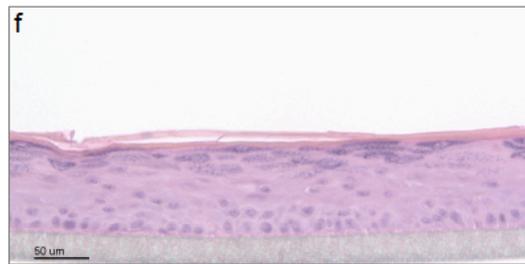
IL-22



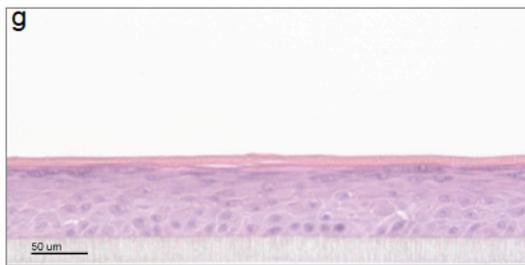
TNF- $\alpha$



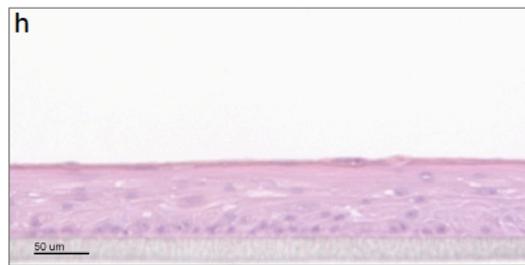
IL-23



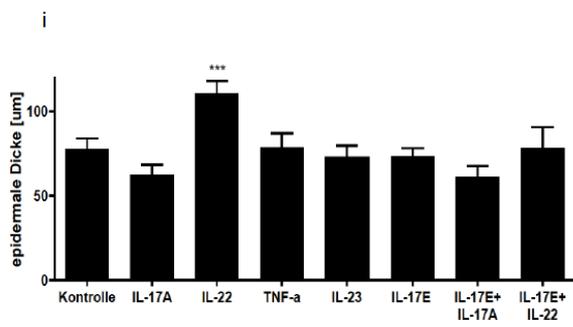
IL-17E



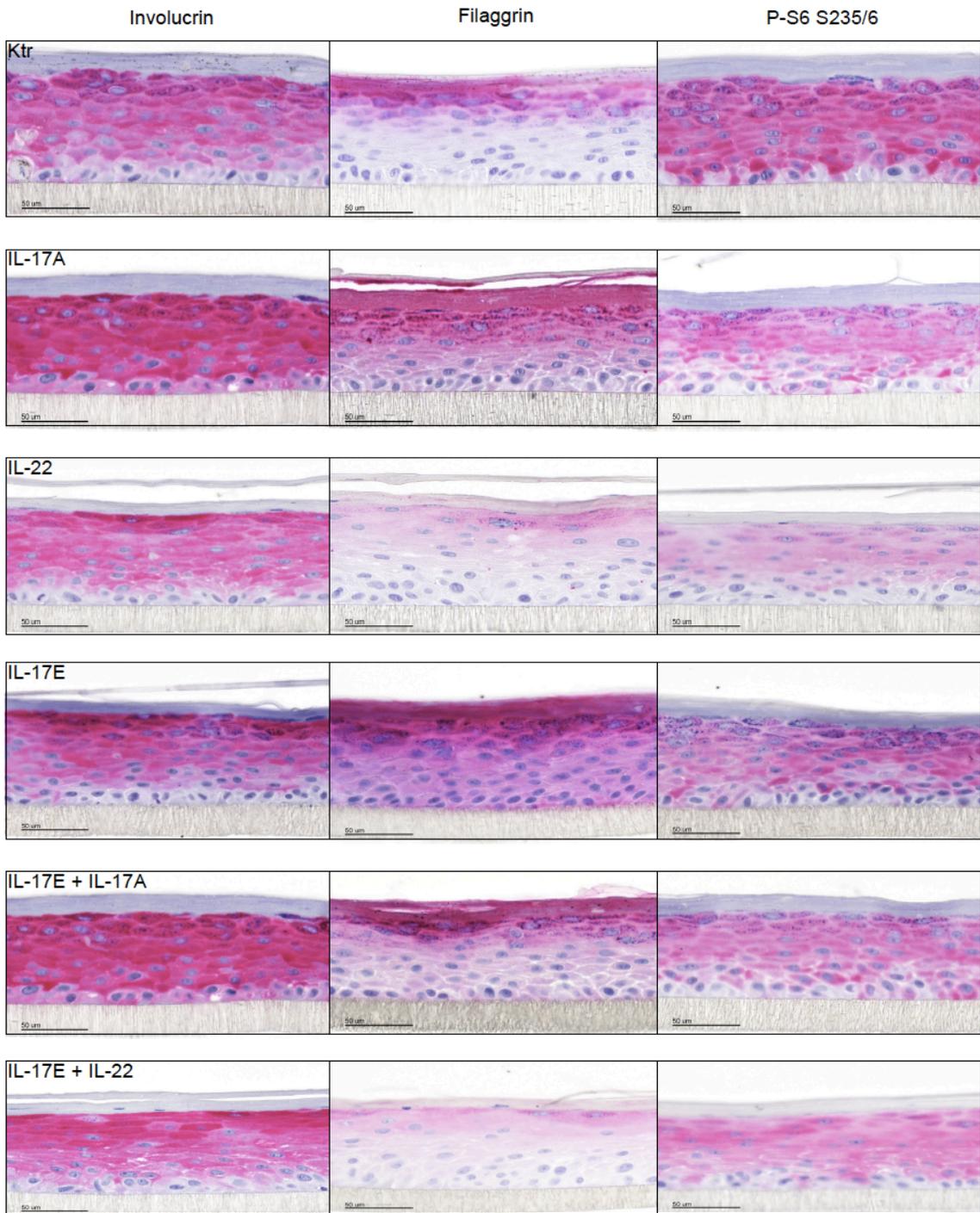
IL-17E + IL-17A



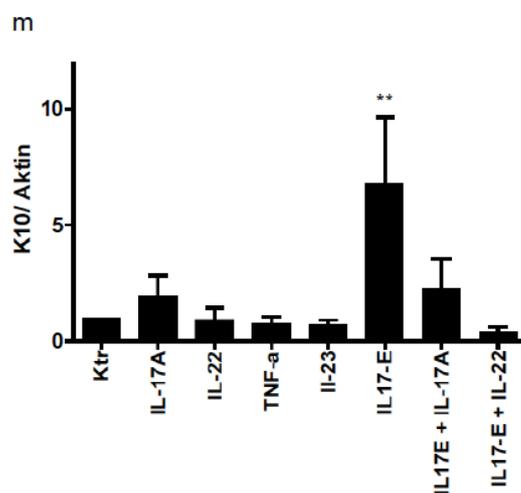
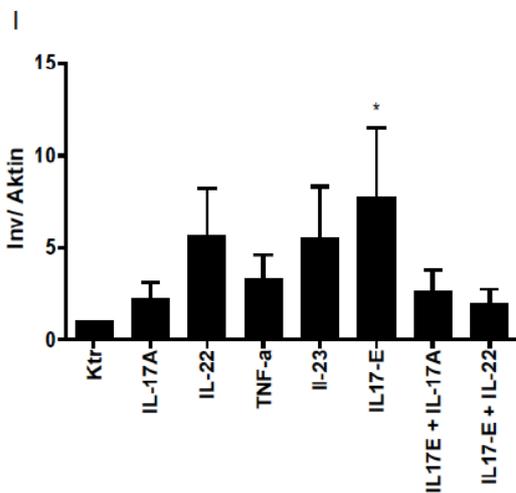
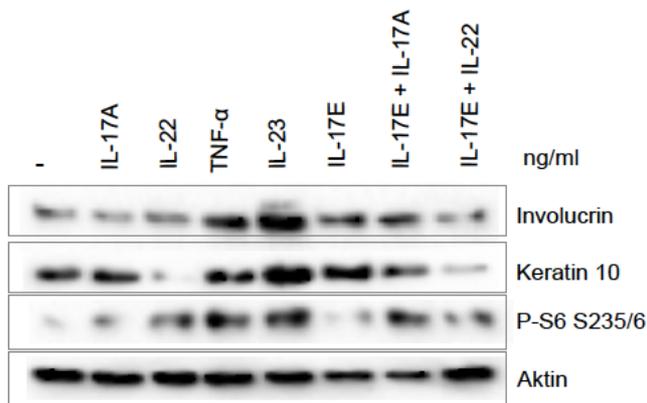
IL-17E + IL-22



j



k



**Abbildung 13: IL-17E führt zu keiner Verdickung der Epidermisschicht, verstärkt aber die Expression von Differenzierungsmarkern**

(a-h): HE-Färbung von dreidimensionalen Epidermisschichten, die mit den gezeigten Zytokinen (IL-17A 20ng/ml, IL-22 20ng/ml, TNF- $\alpha$  0,2ng/ml, IL-23 20ng/ml, IL-17E 50ng/ml, IL-17E 50ng/ml + IL-17A 20ng/ml, IL-17E 50ng/ml + IL-22 20ng/ml) behandelt wurden. Die gezeigten Maßstabsbalken entsprechen 50 $\mu$ m. (i) Darstellung der epidermalen Dicke von n=7-11 gleich durchgeführten Experimenten (Mittelwerte +/- SEM). Die statistische Signifikanz wurde mit einseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet (\*\*\*p  $\leq$  0,001). (j) Immunohistologische Färbung mit den gezeigten Antikörpern. Die gezeigten Maßstabsbalken entsprechen 50 $\mu$ m. (k) Western Blot von Proteinlysaten aus Epidermisschichten. (l+m) Densitometrische Auswertung von n= 5-11 wie in (k) durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01).

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass IL-17E *in vitro* sowohl den Akt/mTOR-, als auch den MAPK-Signalweg aktiviert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass IL-17E über diese intrazellulären Signaltransduktionswege Keratinozytenproliferation fördert. In zwei- und dreidimensionalen Differenzierungsversuchen zeigte IL-17E einen

unerwarteten Effekt auf die epidermale Stratifizierung. Im Gegensatz zu anderen Psoriasis-typischen Zytokinen, welche die Expression von Differenzierungsproteinen hemmen, führt IL-17E zu einer verstärkten Expression von Differenzierungsmarkern wie Involucrin, Keratin 10 und Filaggrin.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bewertung zellulärer Modellsysteme zur Untersuchung der Wirkung von Zytokinen

Um die Wirkung von IL-17E auf Keratinozyten zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT als auch primäre, normale humane Keratinozyten (NHK) verwendet. In den gezeigten Versuchen fielen die Ergebnisse tendenziell gleich aus, wiesen teilweise dennoch im Detail Unterschiede auf.

Zumeist fiel der Effekt von IL-17E in NHK vor allem in der Intensität der Signalwegaktivierung von Akt schwächer aus. Außerdem war insgesamt eine größere Varianz in den Ergebnissen zu beobachten, was an der biologischen Varianz zwischen den verwendeten Zellen liegt. Die Zellen werden von verschiedenen Spendern mit individuellem genetischem und metabolischem Hintergrund isoliert. Des Weiteren können die Zellen von Spendern mit potentiell klinisch unauffälligen Entzündungen stammen. All dies kann beispielsweise zu einem spezifischen individuellen Zytokinrezeptorexpressionsspektrum beitragen, sodass mit Zellen verschiedener Spender eine unterschiedliche Reaktion auf die Zytokinbehandlung zu erwarten ist.

In den Differenzierungsassays war der Effekt von IL-17E interessanterweise in NHK deutlicher. Micallef *et al.* wiesen nach, dass HaCaT-Zellen auch unter Differenzierungsbedingungen proliferative Eigenschaften behalten und gleichzeitig eine Verzögerung in der Expression der Differenzierungsmarker Involucrin und Keratin-10 zeigen [102]. Dies könnte erklären, warum der Effekt auf die Differenzierung in HaCaT abgeschwächt ist. HaCaT-Zellen können nicht so stark differenzieren, weshalb ein potentiell pro-differenzierendes Agens wie IL-17E seinen starken Effekt nicht voll entfalten kann.

Der Vorteil der HaCaT-Zelllinie ist neben den guten Kultivierungseigenschaften, die hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Durch genetische Veränderungen werden Zellen zu einer Zelllinie immortalisiert. Die Zelllinie weist also im Gegensatz zu den primären Keratinozyten, welche Spendervarianzen aufweisen, keine individuellen Unterschiede auf und verfälscht in der Hinsicht dadurch keine Ergebnisse. Colombo *et al.* belegten, dass das Arbeiten mit HaCaT-Zellen eine gut verwendbare Methode für immunologische Studien ist [103]. Nachteil der HaCaT-Zelllinie ist jedoch, dass durch die erwähnten genetischen Veränderungen die natürlichen Eigenschaften und charakterisierenden Merkmale der humanen Keratinozyten verloren gehen können und sogar der gegenteilige Effekt eintreten kann.

HaCaT-Zellen zeigen zudem nicht alle epidermalen Eigenschaften wie primäre Keratinozyten. Demgegenüber stehen die Vorteile der NHK: Die beschriebene genetische und biologische Varianz kann zwar die Interpretation von Ergebnissen erschweren, spiegelt jedoch den Zustand, wie er in der Population zu finden ist, deutlich besser wider. Nachteilig sind die begrenzte Lebensdauer sowie die schwierige Probenbeschaffung und aufwendige Isolation. Somit muss stets abgewogen werden, welches Modell für die experimentelle Fragestellung geeignet ist.

#### 4.2 IL-17E - ein neuer Spieler in der Psoriasis-Pathogenese?

Die IL-17-Zytokinfamilie, bestehend aus IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E und IL-17F, spielt eine besondere Rolle in Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis. Diese Zytokine, welche von TH17-Zellen exprimiert werden und vermehrt in psoriatischen Läsionen aufzufinden sind, weisen untereinander eine hohe Homologie auf [104]. IL-17E hingegen hat die geringste Homologie zu den übrigen Familienmitgliedern. Es wird hauptsächlich von Epithelzellen produziert und wurde bisher eher den TH2-Zytokinen zugeordnet. Obwohl es sich bei der Psoriasis eigentlich um eine TH1-assoziierte Autoimmunerkrankung handelt [105], konnten Senra *et al.* zeigen, dass Keratinozyten läsionaler psoriatischer Haut IL-17E exprimieren [68]. Während bisher belegt ist, dass IL-17A, IL-17F und IL-17C inflammatorische Auswirkungen auf eine Vielzahl von Zellen unter anderem auch auf Keratinozyten haben [106], sind die Zielzellen von IL-17E noch nicht vollständig bekannt. IL-17E bindet an einen heterodimeren Rezeptor bestehend aus IL-17RA und IL-17RB. Letztere Untereinheit wird von Makrophagen exprimiert, welche auf IL-17E reagieren können. Sie polarisieren nach IL-17E-Stimulation in Richtung des M2-Phänotyps und produzieren inflammatorische Zytokine, die an der Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt sind [68]. Neben dieser Rolle in der Differenzierung von Makrophagen, ist auch ein Einfluss von IL-17E auf Keratinozyten und somit in der epidermalen Homöostase denkbar. Senra *et al.* vermuteten bereits eine direkte Wirkung auf das Keratinozytenwachstum und Proliferation [96] und auch Xu *et al.* berichteten bereits über eine autokrine Funktion von IL-17E auf Mauskeratinozyten [99]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob IL-17E eine autokrine Wirkung auf Keratinozyten hat und damit deren Proliferation, Differenzierung und Stratifizierung beeinflusst und somit einen neuen Spieler in der Psoriasis-Pathogenese darstellen könnte.

Keratinozyten exprimieren beide Untereinheiten des IL-17E Rezeptors (IL-17RA und IL-17RB [98], welche für die Bindung von IL-17E nötig sind [97]. Da genauere Hinweise

auf Signalwege, die durch diese Rezeptoren aktiviert werden fehlen, wurde zum einen die Wirkung von IL-17E auf spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege betrachtet, zum anderen wurde die biologische Wirkung von IL-17E auf die epidermalen Vorgänge, welche im Rahmen der Psoriasis-Pathogenese gestört sind, geprüft.

#### 4.2.1 Psoriasis-typische Merkmale von IL-17E

TH1-, das heißt Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-17A und TNF- $\alpha$ , die auch in der Psoriasis-Pathogenese eine Rolle spielen, aktivieren die PI3-K/Akt-Kaskade, den nachgeschalteten mTOR-Komplex sowie den MAPK-Signalweg und beeinflussen damit verschiedene essentielle Zellfunktionen wie Zellproliferation, Wachstum und Differenzierung. Im Besonderen fördern sie Proliferation und hemmen die geordnete epidermale Differenzierung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-17E in HaCaT- und NHK-Zellen eine erhöhte Aktivität des Akt-Signalwegs induziert. Mehrere Arbeiten demonstrierten eine erhöhte PI3-K-Aktivität und Akt-Phosphorylierung in läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zur gesunder Haut [107]. Chamcheu *et al.* beispielsweise zeigten im imiquimodinduzierten Mausmodell eine Hyperaktivierung des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs [108]. Überdies konnten Buerger *et al.* nachweisen, dass PKB/Akt in der Psoriasis hyperphosphoryliert ist, was einen intrinsischen Umbau der Epidermis zur Folge hat und zur phänotypischen Ausprägung der Erkrankung führt [48,58]. Neben PKB/Akt kam es durch IL-17E zur Hyperaktivierung des nachgeschalteten mTOR-Komplexes. Buerger *et al.* wiesen in läsionaler psoriatischer Haut auch aktiviertes mTOR und ribosomales Protein S6 nach [64]. Der mTOR-Komplex kann neben dem PI3-K/Akt-Signalweg über den proinflammatorischen MAPK-Kinase-Signalweg aktiviert werden. Eine Hyperaktivierung der MAPK-Kaskade ist in der Psoriasis sehr gut dokumentiert [109]. Johansen *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass ERK1/2 in läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zur nicht-läsionaler Haut erhöht ist [110]. Die MAPK-Kaskade gemessen durch P-ERK T180/Y182 wurde *in vitro* ebenfalls durch IL-17E induziert.

Da es sowohl unter chemischer Hemmung des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs, als auch durch Inhibition von MEK1/2 zu einer Verminderung der IL-17E-abhängigen Phosphorylierung von Akt, S6 und ERK kam, ist davon auszugehen, dass die IL-17E-induzierte Aktivierung durch den PI3-K/Akt/mTOR- und MAPK-Signalweg vermittelt wird.

Interessanterweise führte IL-17E zu einer deutlich stärkeren Aktivierung des Akt/mTOR- und MAPK-Signalwegs als IL-17A und IL-22, sodass IL-17E sogar noch

bedeutender in der Signalwegaktivierung zu sein scheint. Hingegen induzierte die Kombination von IL-17E mit anderen Zytokinen wider Erwarten keinen additiven Effekt. Grund dafür könnte sein, dass ein Zytokin allein bereits so einen starken Effekt verursacht, dass *in vitro* schnell eine maximale Aktivierung erreicht wird. Weiterführende Forschungen unter *in vivo* Bedingungen könnten Aufschluss über diese Annahme geben. Zusammenfassend induziert IL-17E somit sowohl die PI3-Kinase, sodass in der Folge Akt, mTOR und S6 aktiviert werden, als auch den MAPK-Kinase-Signalweg, der wiederum auch den mTOR-Signalweg aktivieren kann. Somit deuten die hier gezeigten Daten darauf hin, dass der PI3-K/Akt/mTOR- und MAPK Signalweg *in vitro* durch IL-17E hyperaktiviert werden und auch *in vivo* an der Aktivierung des Akt/mTOR- und MAPK-Signalwegs im Rahmen der psoriatischen Entzündung beteiligt sein könnte.

Diese Signalwege spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung von proliferativen Signalen und sind essentiell an der Psoriasis-Pathogenese beteiligt [48,58,64,109,111]. Deshalb war das Ziel zu überprüfen, inwiefern diese Effekte durch IL-17E vermittelt werden. Unter den verschiedenen Funktionen der PI3-K/Akt/mTOR-Signalkaskade stellt sich die Zellproliferation als eine der Wichtigsten dar [65,107,112,113]. Pankow *et al.* wiesen in Mäusen nach, dass PI3-K keratinozytäre Proliferation begünstigt und Differenzierung negativ reguliert [114]. Auch mTORC1 ist essenziell für die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten [61]. Hier konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IL-17E Proliferation induziert, was über den PI3-K/Akt/mTOR- sowie den ERK-Signalweg vermittelt wird.

Die Relation zwischen den genannten Signalwegen und Keratinozytenproliferation konnten auch Zhang *et al.* bestätigen. Diese zeigten ebenfalls eine Hyperaktivierung des PI3-K/Akt-Signalwegs in psoriatischen Läsionen und zudem scheint eine negative Regulation des nachgeschalteten Forkhead-Box-O-Transkriptionsfaktors (FOXO) mit Keratinozytenhyperproliferation einherzugehen [107,115]. Dies geschieht durch Inaktivierung der Zellzyklusinhibitoren p27 und p21 sowie Förderung der Zellzyklusproteine c-Myc und Cyclin D1 [115–118]. Eine erhöhte Akt und MAPK-Kinaseaktivität führt zu verminderter Apoptose und gleichzeitig zu erhöhter Zellproliferation [119]. Li *et al.* zeigten ein ähnliches Verhalten durch die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-22 und TNF- $\alpha$ , welche durch Hyperaktivierung des PI3-K- und Akt-Signalwegs proliferative Effekte unterstützten [120]. Auch Mitra *et al.* unterstrichen, dass eine IL-22 induzierte Proliferation von normalen humanen Keratinozyten vom PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg abhängig ist [112]. Somit unterstützen die gezeigten Daten die Annahme, dass pro-inflammatorische Zytokine und im Besonderen auch IL-17E *in vitro* eine aberrante Hyperproliferation

über den Akt/mTOR-Signalweg induzieren und damit potentiell zur Psoriasis-Pathogenese beitragen. Die Aktivierung des Akt/mTOR-Signalwegs durch IL-17E stände daher mit der Keratinozytenproliferation in Zusammenhang.

Verstärkte, basale Keratinozytenproliferation vergrößert die Zahl der Keratinozytenschichten, sodass es zu einer Akanthose kommt. Im Vergleich zu IL-22 ist der Effekt von IL-17E auf die epidermale Dicke jedoch schwächer, was vermuten lässt, dass IL-17E-abhängige Proliferation alleine nicht zur Ausbildung einer akantnotischen Epidermis ausreichend ist. Zirkulierendes IL-22 ist bei Psoriasis-Patienten signifikant höher, wird von T-Zellen psoriatischer Haut vermehrt produziert, trägt zur keratinozytären epidermalen Hyperplasie der Psoriasis bei und induziert eine Akanthose [107,121,122]. Mitra *et al.* verifizierten eine Induktion der Proliferation durch IL-22 über den PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg [112]. Somit scheint sich IL-17E trotz proliferativer Eigenschaften wie IL-22 eher wie andere Psoriasis-induzierende Zytokine zu verhalten. So konnten Wolk *et al.* zeigen, dass im Gegensatz zu IL-22 auch IL-17A, TNF- $\alpha$  und IL-23 nicht zu einer Akanthose in einem 3D-Epidermismodell beitragen [123]. Somit scheint auch IL-17E seine pathologischen Effekte in der Epidermis mittels anderer Mechanismen zu vermitteln. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit - vor allem in primären Keratinozyten - deutlich, wie aberrante mTORC1 Aktivierung durch inflammatorische Zytokine zur Veränderung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Differenzierung beiträgt. Unter normalen Bedingungen wird mTORC1 abgeschaltet, sobald Zellen das proliferative Kompartiment verlassen und Differenzierung einleiten. In Gegenwart zu IL-17E blieb die Aktivität in differenzierenden Zellen jedoch erhalten. Somit kann angenommen werden, dass IL-17E pathologische Effekte in der Haut über mTORC1 vermittelt. mTOR ändert durch Stimulation mit IL-17E seinen Aktivierungszustand und trägt damit zu epidermaler Hyperproliferation und veränderter Differenzierung bei.

Zusammenfassend deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass IL-17E einige Charakteristika aufweist, die für eine Zuordnung zur Gruppe der Psoriasis-induzierenden TH1-Zytokinen sprechen. Ähnlich wie Zytokine dieser Gruppe, z.B. IL-1 $\beta$ , IL-17A und TNF- $\alpha$ , aktiviert IL-17E die PI3-K/Akt/mTOR- und MAPK-Kaskaden [48] in Keratinozyten, induziert damit Hyperproliferation und kann damit potentiell zur Psoriasis-Pathogenese beitragen.

#### 4.2.2 Distinktive Merkmale von IL-17E gegenüber anderen Psoriasis-typischen Zytokinen

In der vorliegenden Arbeit konnte aber auch gezeigt werden, dass IL-17E Merkmale aufweist, die im Vergleich zu den übrigen Psoriasis-Zytokinen eher untypisch sind.

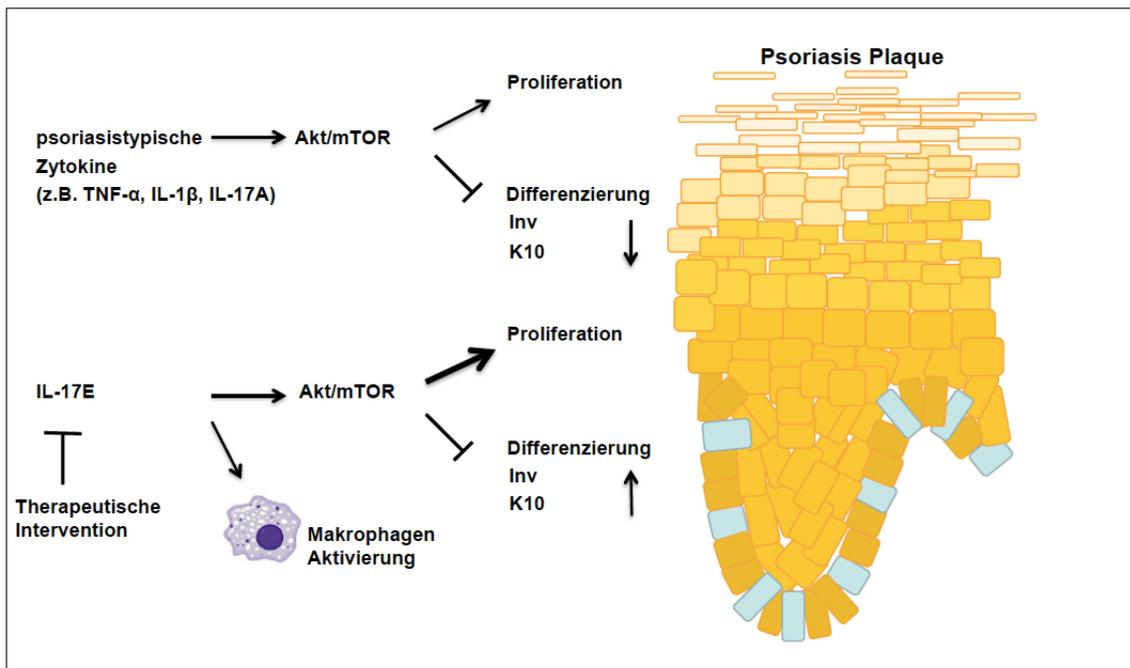
Im Gegensatz zu den Vergleichszytokinen konnte nachgewiesen werden, dass IL-17E sowohl in HaCaT- als auch in NHK-Zellen zu einer erhöhten Expression von Differenzierungsmarkern wie Keratin-10 und Involucrin führte, während die Vergleichszytokine *in vitro* zu einer verringerten Expression der Marker führten [48,60]. Somit scheint IL-17E den Prozess der terminalen Differenzierung eher zu begünstigen, was im Gegensatz dazu steht, dass IL-17E im Kontext von atopischer Dermatitis die Expression des späten Differenzierungsmarkers Filaggrin hemmt [93,124]. Auch Psoriasis-typische Zytokine induzieren eher den gegenteiligen Effekt auf die terminale Differenzierung. Pfaff *et al.* zeigten, dass im organotypischen 3D-Hautmodell IL-17A die Expression vieler Gene wie Filaggrin unterdrückte, was folglich zur Inhibition der Differenzierung führte [125]. Wolk *et al.* wiesen ein ähnliches Muster für IL-22 nach, welches durch herabgesetzte Expression von Filaggrin und Keratin-10 zur Hemmung der Differenzierung führte [121,126]. Histologisch ist eine verminderte Differenzierung zu erkennen, welche im gesunden Zustand die Auflösung des Zellkerns und die Bildung einer nichtlöslichen Proteinverdichtung, einer mechanisch resistenten Hornschicht, beinhaltet [123]. Die Untersuchung des IL-22-Effekts im dreidimensionalen Hautmodell in dieser Arbeit zeigte ebenso eine reduzierte Expression von Involucrin und Filaggrin, was auf eine verminderte terminale Keratinozytendifferenzierung hinweist. Interessanterweise überwog bei der Kombination von IL-17E mit anderen Zytokinen aber der hemmende Effekt dieser Zytokine.

Es lässt sich somit die Hypothese ableiten, dass *in vivo* die pathologische Wirkung der Zytokine auf einer kombinierten Wirkung von IL-17A und IL-17E beruht. So könnte IL-17E vor allem für die epidermale Hyperproliferation verantwortlich sein, während IL-17A für eine abnormale epidermale Differenzierung bedeutsamer zu sein scheint. Insgesamt könnte IL-17E somit als Schlüsselzytokin in die epidermale Homöostase eingreifen, indem es das Gleichgewicht zwischen Keratinozytenproliferation und Differenzierung stört. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass IL-17E auch die mit Hyperproliferation verbundenen Keratine K6, K16 und K17 induziert [98]. Der mögliche kausale Zusammenhang zwischen den beiden Isoformen IL-17A und IL-17E bleibt jedoch unvollständig verstanden.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass verglichen mit anderen Psoriasis-typischen Zytokinen und im Besonderen im Vergleich zu anderen Mitgliedern der IL-17-Familie, IL-17E einige Ähnlichkeiten, aber auch wesentliche Unterschiede aufzeigt (Abb. 14). Pro-inflammatorische Zytokine und auch IL-17E aktivieren in Keratinozyten den PI3-K/Akt/mTOR- und MAPK-Signalweg [48] und induzieren damit Proliferation. Bezogen auf die Keratinozytendifferenzierung zeigt IL-17E jedoch distinktive Merkmale: Während Psoriasis-typische Zytokine wie IL-17A, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durch chronische Akt/mTOR-Aktivierung Proliferation induzieren und Differenzierung hemmen, führt IL-17E hingegen zu einer Hochregulation von Differenzierungsmarkern und kann damit terminale Differenzierung eher fördern. Daher werden gegenwärtig andere Mechanismen untersucht mittels derer IL-17E seine pathologische Wirkung potentiell entfaltet. So konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Boehncke und Dr. Brembilla mittels Time-lapse Analysen zeigen, dass IL-17E die Zellmotilität durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts signifikant beeinflusst [98].

Im Zusammenspiel mit dem restlichen Zytokinmilieu scheint IL-17E somit zusätzlich zur bisher bekannten Funktion auf Immunzellen auch direkt auf Keratinozyten zu wirken und über verschiedene Pathomechanismen zur Psoriasis-Entstehung beizutragen (Abb. 14).

Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen insbesondere im Hinblick auf mögliche Wechselwirkungen zwischen IL-17E und anderen Komponenten des jeweiligen krankheitsspezifischen Zytokin-Milieus, um die genaue Wirkung von aberranter IL-17E-Expression in der Epidermis zu verstehen. Im Besonderen müssen hier die unterschiedlichen Effekte in den verschiedenen Dermatosen wie Psoriasis, atopischer Dermatitis und Kontaktdermatitis, bei denen eine Überexpression von IL-17E gezeigt werden konnte, untersucht werden.



**Abbildung 14: Auswirkungen von IL-17E und anderen Psoriasis-typischen Zytokinen auf die epidermale Homöostase (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [37])**

Pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-22) fördern durch aberrante Aktivierung des Akt/mTOR Signalwegs Keratinozytenproliferation, während Differenzierung durch Herunterregulation von Involucrin (Inv) und Keratin 10 (K10) gehemmt wird. IL-17E hingegen induziert einerseits Makrophagendifferenzierung, wodurch andere Immunzellen rekrutiert werden. Andererseits induziert es über den Akt/mTOR Signalweg die Proliferation von Keratinozyten und die Hochregulation von Involucrin (Inv) und Keratin-10. In der Summe können diese Effekte zu den phänotypischen Hautveränderungen der Psoriasis beitragen.

### 4.3 IL-17E als neues Target für die Psoriasis-Therapie?

Für die Therapie der Psoriasis stehen unterschiedliche Behandlungsmethoden mit diversen Wirkansätzen zur Verfügung. Die Wahl der Behandlung ist von verschiedenen Faktoren wie dem Ausmaß der Erkrankung, dem Alter, dem individuellen Einfluss der Erkrankung auf das Leben des Patienten sowie dem Vorhandensein möglicher Komorbiditäten abhängig. Zusätzliche Erkrankungen, welche auch medikamentös behandelt werden, können Einfluss auf die Therapiemöglichkeiten haben. Abhängig vom Ausprägungsgrad wird entweder eine topische, eine systemische Therapie oder eine Kombination aus beiden herangezogen. Zur erfolgreichen Behandlung schwerer Psoriasis können zielgerichtete, gentechnisch hergestellte Biologika als therapeutische Option herangezogen werden. Diese Antikörper richten sich direkt gegen Schlüsselzytokine wie TNF- $\alpha$  und Mitglieder der IL-17-Familie.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-17E in Keratinozyten zu einer Hyperaktivierung des PI3-K/PKB/Akt/mTOR-Signalwegs führt und durch gesteigerte Proliferation und aberrante Differenzierung potentiell zum psoriatischen Phänotyp

beitragen kann. IL-17E könnte somit einen weiteren interessanten therapeutischen Ansatzpunkt darstellen. Die gezeigten Ergebnisse zeigen *in vitro* sogar einen stärkeren Effekt von IL-17E auf die Differenzierung als IL-17A. IL-17A stellt bereits einen Angriffspunkt für verschiedene Biologika dar, welche entweder auf das Zytokin IL-17A wie beispielsweise Secukinumab und Ixekizumab [127,128] oder auf den Rezeptor IL-17RA wie Brodalumab [129] abzielen. Es zeigte sich eine höhere Wirksamkeit durch die Blockade des Rezeptors [76]. Grund hierfür könnte die gleichzeitige Inhibition von IL-17F, IL-17C und IL-17E sein, welche ebenfalls an IL-17RA binden. Der gute Effekt lässt sich möglicherweise auch durch eine Wirkung auf IL-17E erklären, denn IL-17E bindet an IL-17RA und IL-17RB [92]. Die breite Wirkung von Brodalumab hat aber auch potentiell negative Effekte. IL-17F und IL-17C können vor entzündlichen Darmerkrankungen schützen, sodass eine Blockade derer das Risiko einer Nebenwirkung erhöht [78].

Folglich wäre es interessant lediglich IL-17E mittels Antikörpern zu neutralisieren [76]. Die gezielte Blockade von IL-17E könnte als neuer nebenwirkungsarmer Therapieansatz das äußere Erscheinungsbild der Haut positiv beeinflussen. Eine andere Möglichkeit wäre es mehrere Schlüsselzytokine, nämlich IL-17E, IL-17A und IL-17F gleichzeitig zu inhibieren. Bimekizumab, ein bispezifischer Antikörper gegen IL-17A und IL-17F, zeigte bereits vielversprechende Erfolge [76]. Die zusätzliche Hemmung von IL-17E könnte sich somit als noch überlegener darstellen, die phänotypischen Ausprägungen verbessern, Komorbiditäten reduzieren und die Lebensqualität der Patienten steigern.

Die Therapie mittels Neutralisierung von Zytokinen wirkt eher am Anfang der Kaskade, was sich als wirksam erweist, aber auch mehr Nebenwirkungen mit sich bringt. Daher ist auch die Entwicklung neuer topischer Therapiemaßnahmen mit einer spezifischen Wirkung auf Mechanismen in Keratinozyten wünschenswert, was potentiell auch mit weniger Nebenwirkungen verbunden ist. Daher und auf Grund der epidermalen Überexpression wäre auch die topische Applikation eines Inhibitors der IL-17E-Wirkung potentiell erfolgsversprechend.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen erneut, welche gravierenden Effekte ein verändertes Zytokinmuster auf epidermale Signalwege hat und damit zur Dysfunktion beiträgt. Die aktivierten Signalwege wie der PI3-K/PKB/Akt/mTOR-Signalweg können also ebenfalls einen medikamentösen Angriffspunkt in der Psoriasis-Behandlung darstellen [107]. Einige ältere Studien beschäftigten sich bereits mit der Hemmung von mTOR. Das Immunsuppressivum Sirolimus [107,130] und dessen Derivat Everolimus [131] beispielsweise wirken durch Komplexbildung mit mTOR antiproliferativ und antiinflammatorisch [107]. Topische Applikation von Sirolimus verminderte zwar den

klinischen Score, zeigte aber keine Verbesserung der Plaquedicke und erythematösen Veränderungen [132]. Weiterhin konnten Datta-Mitra *et al.* nachweisen, dass 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3-3-bromoacetate (BE), ein Vitamin-D Abkömmling, durch die Hemmung von PKB/Akt und nachgeschaltet durch mTOR einen antimitotischen, antiproliferativen und proapoptischen Effekt auf normale humane Keratinozyten (NHK) ausübt [65]. Auch Buerger *et al.* konnten zeigen, dass eine topische Behandlung mit Rapamycin das Ausmaß der imiquimodinduzierten Psoriasis im Mausmodell lindert [63]. Diese Daten gaben weitere Hinweise darauf, dass der Akt/mTOR-Signalweg von zentraler Bedeutung ist. Daher könnte es erfolgsversprechend sein, Rapamycin und dessen Derivate weiterhin im Therapieverfahren zu untersuchen oder nach neuen Inhibitoren zu forschen. Die hier gezeigten Daten liefern somit weiteren Anhalt, dass die Entwicklung spezifischer Inhibitoren beispielsweise für den auch durch IL-17E-aktivierten Akt/mTOR-Signalweg erstrebenswert ist und somit weitere topische Behandlungsoptionen ein zu erforschender Ansatz sind.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit *in vitro* gezeigt werden, dass IL-17E einen autokrinen Effekt auf Keratinozyten ausübt, indem es Proliferation fördert sowie aberrante Expression von Differenzierungsproteinen verursacht. Diese Wirkungen von IL-17E deuten auf eine potentielle Rolle des Zytokins in der epidermalen Physiologie und im Rahmen der Psoriasispathogenese hin, welche vor allem im Hinblick auf therapeutische Interventionsmöglichkeiten genauer untersucht werden sollte.

## 5 Zusammenfassung

Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, welche phänotypisch durch scharf abgegrenzte, erythemato-squamöse Plaques gekennzeichnet ist. Nicht nur die charakteristischen Hautveränderungen, sondern auch verschiedene assoziierte Komorbiditäten tragen zur einer massiven Beeinträchtigung der Lebensqualität der Psoriasis-Erkrankten bei. Pathophysiologisch ist die Psoriasis durch ein Nebeneinander von epidermaler Hyperproliferation mit gestörter Keratinozytendifferenzierung, Extravasation von Lymphozyten und Angio(neo)genese charakterisiert. Grund hierfür ist unter anderem die aberrante Expression von Zytokinen der IL-17-Familie wie IL-17A und IL-17F. Biologika, welche diese Zytokine oder deren Rezeptoren targetieren, zeigen sehr gute therapeutische Erfolge.

IL-17E, auch bekannt als IL-25, wurde bisher den TH2-Zytokinen zugeordnet, welche bei TH2-vermittelten Erkrankungen wie Allergien oder der Atopischen Dermatitis (AD) eine Rolle spielen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass auch IL-17E in psoriatischen Läsionen überexprimiert wird und dort Effekte auf Makrophagen ausübt. Aber auch Keratinozyten kommen als Zielzellen von IL-17E in Frage, da diese ebenfalls die entsprechenden IL-17E Rezeptoruntereinheiten IL-17RA und IL-17RB exprimieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher die Wirkung dieses Zytokins auf Keratinozyten zu untersuchen und damit dessen potentiellen Beitrag zur Pathogenese aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17E via des PI3-K/Akt/mTOR- und MAPK-Signalwegs auf zellulärer Ebene einen autokrinen Effekt auf Keratinozyten hat. Dadurch induziert IL-17E Proliferation sowie erhöhte Expression von Differenzierungsproteinen wie Keratin-10 und Involucrin. Diese epidermalen Veränderungen können somit potentiell zu einer epidermalen Dysfunktion führen und damit zum psoriatischen Phänotyp beitragen. Zusammenfassend deuten die hier gewonnenen Daten darauf hin, dass IL-17E eine Rolle in der Psoriasis-Pathogenese spielt und damit potentiell einen neuen Angriffspunkt für die Entwicklung anti-psoriatischer Therapien darstellen kann.

## 6 Summary

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, which is characterized by sharply demarcated erythematous-squamous plaques. Not only the typical skin alterations, but also different associated co-morbidities contribute to a massive impairment of the quality of life of psoriasis patients. Pathophysiologically, psoriasis is characterized by epidermal hyperproliferation and aberrant differentiation of keratinocytes, as well as lymphocyte extravasation and angiogenesis. These processes are regulated through aberrant expression of proinflammatory Th1 cytokines, especially cytokines of the IL-17 family such as IL-17A and IL-17F. So far, the novel family member IL-17E, also known as IL-25, has been attributed to the Th2 cytokines family, whose members play a role in Th2-mediated diseases such as allergies or atopic dermatitis (AD). However, recent studies show that IL-17E is also overexpressed in psoriatic lesions and exerts effects on macrophages. However, keratinocytes seem to be target cells of IL-17E as well, since they also express the corresponding IL-17E receptor subunits IL-17RA and IL-17RB.

Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of IL-17E on keratinocytes and to elucidate its potential contribution to the pathogenesis of psoriasis. It could be shown that IL-17E has an autocrine effect on keratinocytes via the PI3-K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways and induces proliferation as well as aberrant expression of differentiation markers such as keratin-10 and involucrin, which results in an aberrant maturation of keratinocytes. These epidermal changes can potentially lead to epidermal dysfunction and thus contribute to the psoriatic phenotype. In summary, the data obtained here show that IL-17E might play a role in the pathogenesis of psoriasis and that IL-17E can potentially present a novel target for the development of anti-psoriatic therapies.

## 7 Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
AD	Atopische Dermatitis
Ali	Air liquid interface
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	CC-Chemokin-Ligand
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dimethylsulfoxid)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-Linked Immunoassay
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2)
FCS	Fetales Kälberserum
FOXO	Forkhead-Box-Proteine O
GAP	GTPase-activating protein
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor gebundenes Protein 2)
GTPase	Guanosin-5-triphosphat-Protease
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperatur (Humane adulte Keratinozyten, niedriges Kalziummilieu, erhöhte Temperatur)
HBSS	Hanks Basal Sodium Saline
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA-Gen	Humanes Leukozytenantigen-Gen

HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
H <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor of nuclear factor κB (Inhibitor des nukleären Transkriptionsfaktors κB)
IKK	Inhibitor of nuclear factor κB kinase (Inhibitor des nukleären Transkriptionsfaktors κB-Kinase)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
Inv	Involucrin
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
JAK	Janus-Kinase
K	Keratin
LC3	Autophagosome-associated protein light chain 3
LL-37	Antimikrobielles Peptid LL-37
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1
MEK	p42/44 MAPK/extracellular signal-regulated kinase (p42/44 MAPK/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase aktivierende Kinase)
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin (Ziel des Rapamycins im Säugetier)
mTORC1/2	mTOR complex 1/2 (mTOR-Komplex 1/2)
NaCl 0,9%	Natriumchlorid 0,9%
NFκB	Nuclear factor κB (Nukleärer Transkriptionsfaktor κB)
NHK	Normal human keratinocytes
P	Phospho
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDE-4	Phosphodiesterase-4
PK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase (3-Phosphoinositid abhängige Proteinkinase 1)
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PSORS loci	Psoriasis Suszeptibilitäts-Loci

PVDF	Polyvinylidenfluorid
p42/44	p42/44 mitogen-activated protein kinase
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma protein (Rasch beschleunigtes Fibrosarkom-Protein)
Rapamycin	mTOR-Inhibitor I
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR (Regulatorisch verbundenes Protein von mTOR)
RAF	Rasch beschleunigtes Fibrosarkom-Protein
RAS	Rat sarcoma protein (Ratten-Sarkom-Protein)
S	Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SHC	Src-homologe Domäne 2 Protein
SOS	Son of Sevenless (Guanosin-5-triphosphat gebundener Austauschfaktor son of sevenless)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
S6	ribosomales Protein S6
S6K	S6-Kinase
T	Threonin
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-buffered saline with Tween (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TH, Th	T-Helfer-Lymphozyt
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$ (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )
TRAF	TNF receptor associated factors
TSC1/2	Tuberous sclerosis 1/2
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonalaureat
UV	Ultraviolettstrahlung
WB	Western Blot
WST-1	water soluble tetrazolinium

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Haut.....	1
Abbildung 2: Klinische Merkmale der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [11]).....	4
Abbildung 3: Histopathologische Vorgänge der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [8]).....	6
Abbildung 4: Immunpathogenese der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors aus [8])	7
Abbildung 5: Die PI3-K/Akt/mTOR-Signalkaskade (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [37]).....	10
Abbildung 6: Regulation durch mTOR (mit Genehmigung des Autors aus [48]).....	14
Abbildung 7: Der Einfluss von IL-17E in der Psoriasis (mit Genehmigung des Autors aus [68]).....	17
Abbildung 8: Aufklärung der Wirkung von IL-7E auf Keratinozyten .....	18
Abbildung 9: IL-17E induziert in Keratinozyten die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 über den PI3-K/Akt- und den MAPK-Signalweg.....	34
Abbildung 10: IL-17E induziert in Kertinozyten die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 über den PI3-K/Akt- und den MAPK-Signalweg.....	36
Abbildung 11: IL-17E induziert Proliferation mittels des PI3-K/Akt-Signalwegs.....	38
Abbildung 12: IL-17E verstärkt die Expression von Keratin-10.....	41
Abbildung 13: IL-17E führt zu keiner Verdickung der Epidermisschicht, verstärkt aber die Expression von Differenzierungsmarkern .....	46
Abbildung 14: Auswirkungen von IL-17E und anderen Psoriasis-typischen Zytokinen auf die epidermale Homöostase (mit Genehmigung des Autors modifiziert nach [37]).....	55

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zu den verwendeten Geräten mit Angabe des Herstellers.....	19
Tabelle 2: Übersicht zu den verwendeten Materialien mit Angabe des Herstellers .....	20
Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers .....	21
Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Zytokine mit Artikelnummer und Hersteller.....	22
Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Antikörper mit Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.....	23
Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten chemischen Inhibitoren mit Konzentration, Artikelnummer und Hersteller .....	24
Tabelle 7: Übersicht der Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung .....	24
Tabelle 8: Zellzahl und Mediumvolumina zur Aussaat bei Versuchen.....	26

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 **Welsch U, Deller T.** Lehrbuch Histologie. 3. Auflage. Amsterdam: Urban & Fischer in Elsevier, S. 465-485, 2010
- 2 **Moll I.** Duale Reihe: Dermatologie. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme, S. 2-16; 462-472, 2005
- 3 **Fritsch P.** Dermatologie und Venerologie für das Studium. 1. Auflage. Heidelberg, Berlin: Springer, S. 6-76, 2009
- 4 **Lüllmann-Rauch R.** Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme, S. 526-551, 2009
- 5 **Dang NN, Pang SG, Song HY, An LG, Ma XL.** Filaggrin silencing by shRNA directly impairs the skin barrier function of normal human epidermal keratinocytes and then induces an immune response. *Brazilian J Med Biol Res* 2015; 48: 39–45
- 6 **Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W.** Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2013; 1833: 3471–3480
- 7 **Hoste E, Kemperman P, Devos M, Denecker G, Kezic S, Yau N, Gilbert B, Lippens S, De Groote P, Roelandt R, Van Damme P, Gevaert K, Presland RB, Takahara H, Puppels G, Caspers P, Vandenabeele P, Declercq W.** Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 2233–2241
- 8 **Boehncke WH, Schön MP.** Psoriasis. *Lancet* 2015; 386: 983–994
- 9 **Kolios AGA, Yawalkar N, Anliker M, Boehncke WH, Borradori L, Conrad C, Gilliet M, Häusermann P, Itin P, Laffitte E, Mainetti C, French LE, Navarini AA.** Swiss S1 Guidelines on the Systemic Treatment of Psoriasis Vulgaris. *Dermatology* 2016; 232: 385–406
- 10 **Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM.** Psoriasis: Epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: ii18–ii23
- 11 **Schön MP, Boehncke WH.** Psoriasis. *N Engl J Med* 2005; 352: 1899–1912
- 12 **Nast A, Boehncke W-H, Mrowietz U, Ockenfels H-M, Philipp S, Reich K, Rosenbach T, Sammain A, Schlaeger M, Sebastian M, Sterry W, Streit V, Augustin M, Erdmann R, Klaus J, Koza J, Müller S, Orzechowski H-D, Rosumeck S, Schmid-Ott G, Weberschock T, Rzany B.** S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris Update 2011. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft* 2011; 9: S1–S95
- 13 **Pathirana D, Ormerod AD, Saiag P, Smith C, Spuls PI, Nast A, Barker J,**

- Bos JD, Burmester GR, Chimenti S, Dubertret L, Eberlein B, Erdmann R, Ferguson J, Girolomoni G, Gisondi P, Giunta A, Griffiths C, Hönigsmann H, Hussain M, Jobling R, Karvonen SL, Kemeny L, Kopp I, Leonardi C, MacCarone M, Menter A, Mrowietz U, Naldi L, Nijsten T, Ortonne JP, Orzechowski HD, Rantanen T, Reich K, Reytan N, Richards H, Thio HB, Van De Kerkhof P, Rzany B.** European S3-guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2009; 23: 5–70
- 14 **Kimball AB, Gladman D, Gelfand JM, Gordon K, Horn EJ, Korman NJ, Korver G, Krueger GG, Strober BE, Lebwohl MG.** National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities and recommendations for screening. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58: 1031–1042
- 15 **Boehncke WH, Buerger C, Boehncke S.** Komorbiditäten bei Psoriasis vulgaris. *Hautarzt* 2009; 60: 116–121
- 16 **Boateng EA, East L.** The impact of dialysis modality on quality of life: A systematic review. *J Ren Care* 2011; 37: 190–200
- 17 **Hanefeld M, Schaper F, Ceriello A.** Geschichte und Definition(en) des metabolischen Syndroms. *Internist (Berl)* 2007; 48: 117–125
- 18 **Enamandram M, Kimball AB.** Psoriasis epidemiology: The interplay of genes and the environment. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 287–289
- 19 **Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H.** Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol* 2012; 39: 231–241
- 20 **Capon F.** The genetic basis of psoriasis. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1–9
- 21 **Murphy M, Kerr P, Grant-Kels JM.** The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007; 25: 524–528
- 22 **Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG.** Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445: 866–873
- 23 **Engler D, Chezuba HP, Masuku P.** Psoriasis. *SA Pharm J* 2017; 84: 38–42
- 24 **Tschachler E.** Psoriasis: the epidermal component. *Clin Dermatol* 2007; 25: 589–595
- 25 **Kragballe K, Noerrelund KL, Lui H, Ortonne JP, Wozel G, Uurasmaa T, Fleming C, López Estebaranz JL, Hanssen LI, Persson LM.** Efficacy of once-daily treatment regimens with calcipotriol/betamethasone dipropionate ointment and calcipotriol ointment in psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 2004; 150: 1167–1173
- 26 **Boehncke WH.** Moderne Psoriasisstherapie: Evidenzbasiert, patientengerecht, zielorientiert. *Hautarzt* 2012; 63: 589–596
- 27 **Schafer PH, Day RM.** Novel systemic drugs for psoriasis: Mechanism of action

- for apremilast, a specific inhibitor of PDE4. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68: 1041–1042
- 28 **Conrad C, Gilliet M.** Psoriasis: from Pathogenesis to Targeted Therapies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018; 54: 102–113
- 29 **Wu JJ, Lynde CW, Kleyn CE, Iversen L, van der Walt JM, Carvalho A, Kirby B, Bissonette R.** Identification of key research needs for topical therapy treatment of psoriasis – a consensus paper by the International Psoriasis Council. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2016; 30: 1115–1119
- 30 **Hsu L, Armstrong AW.** JAK inhibitors: Treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis. *J Immunol Res* 2014; 2014: 1–7
- 31 **De Medeiros AKA, Speeckaert R, Desmet E, Van Gele M, De Schepper S, Lambert J.** JAK3 as an emerging target for topical treatment of inflammatory skin diseases. *PLoS One* 2016; 11: e0164080
- 32 **Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 2007; 129: 1261–1274
- 33 **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (80- )* 2005; 307: 1098–1101
- 34 **Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuhleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD.** Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J* 2007; 404: 15–21
- 35 **Burgering BMT, Coffey PJ.** Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995; 376: 599–602
- 36 **Sale EM, Sale GJ.** Protein kinase B: Signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 113–127
- 37 **Buerger C.** Epidermal mTORC1 signaling contributes to the pathogenesis of psoriasis and could serve as a therapeutic target. *Front Immunol* 2018; 9: 1–7
- 38 **Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD.** TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Mol Cell* 2012; 47: 535–546
- 39 **Laplane M, Sabatini DM.** mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149: 274–293
- 40 **Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J.** Tuberous Sclerosis Complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 2003; 13: 1259–1268
- 41 **Saxton RA, Sabatini DM.** mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and

- Disease. *Cell* 2017; 168: 960–976
- 42 **Benjamin D, Hall MN.** mTORC1: Turning off is just as important as turning on. *Cell* 2014; 156: 627–628
- 43 **Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM.** PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol Cell* 2007; 25: 903–915
- 44 **Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL.** Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003; 17: 1829–1834
- 45 **Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J.** Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 2005; 15: 702–713
- 46 **Laplante M, Sabatini DM.** Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 2013; 126: 1713–1719
- 47 **Nandagopal N, Roux PP.** Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation* 2015; 3: e983402
- 48 **Buerger C, Shirsath N, Lang V, Berard A, Diehl S, Kaufmann R, Boehncke WH, Wolf P.** Inflammation dependent mTORC1 signaling interferes with the switch from keratinocyte proliferation to differentiation. *PLoS One* 2017; 12: e0180853
- 49 **Kim JH, Yoon MS, Chen J.** Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mediates amino acid inhibition of insulin signaling through serine 727 phosphorylation. *J Biol Chem* 2009; 284: 35425–35432
- 50 **Manning BD, Toker A.** AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017; 169: 381–405
- 51 **Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, Loewith R.** TORC2 Structure and Function. *Trends Biochem Sci* 2016; 41: 532–545
- 52 **Perl A.** Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 12: 169–182
- 53 **Mohankumar V, Dhanushkodi NR, Raju R.** Sindbis virus replication, is insensitive to rapamycin and torin1, and suppresses Akt/mTOR pathway late during infection in HEK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406: 262–267
- 54 **Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM.** Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22: 159–168
- 55 **Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ.** Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 2007; 28: 463–491
- 56 **Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS,**

- Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 18623–18632
- 57 Duncia J V., Santella JB, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE. MEK inhibitors: The chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorganic Med Chem Lett* 1998; 8: 2839–2844
- 58 Buerger C, Richter B, Woth K, Salgo R, Malisiewicz B, Diehl S, Hardt K, Boehncke S, Boehncke WH. Interleukin-1B interferes with epidermal homeostasis through induction of insulin resistance: Implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2206–2214
- 59 Calautti E, Li J, Saoncella S, Brissette JL, Goetinck PF. Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *J Biol Chem* 2005; 280: 32856–32865
- 60 Naeem AS, Zhu Y, Di WL, Marmioli S, O'Shaughnessy RFL. AKT1-mediated Lamin A/C degradation is required for nuclear degradation and normal epidermal terminal differentiation. *Cell Death Differ* 2015; 22: 2123–2132
- 61 Ding X, Bloch W, Iden S, Rüegg MA, Hall MN, Leptin M, Partridge L, Eming SA. mTORC1 and mTORC2 regulate skin morphogenesis and epidermal barrier formation. *Nat Commun* 2016; 7: 13226
- 62 Rogerson C, O'Shaughnessy RFL. Protein kinases involved in epidermal barrier formation: The AKT family and other animals. *Exp Dermatol* 2018; 27: 892–900
- 63 Buerger C, Shirsath N, Lang V, Diehl S, Kaufmann R, Weigert A, Han YY, Ringel C, Wolf P. Blocking mTOR signalling with rapamycin ameliorates imiquimod-induced psoriasis in mice. *Acta Derm Venereol* 2017; 97: 1087–1094
- 64 Buerger C, Malisiewicz B, Eiser A, Hardt K, Boehncke WH. Mammalian target of rapamycin and its downstream signalling components are activated in psoriatic skin. *Br J Dermatol* 2013; 169: 156–159
- 65 Datta Mitra A, Raychaudhuri SP, Abria CJ, Mitra A, Wright R, Ray R, Kundu-Raychaudhuri S. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin-D3-3-bromoacetate regulates AKT/mTOR signaling cascades: A therapeutic agent for psoriasis. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 1556–1564
- 66 Akinduro O, Sully K, Patel A, Robinson DJ, Chikh A, McPhail G, Braun KM, Philpott MP, Harwood CA, Byrne C, O'Shaughnessy RFL, Bergamaschi D.

- Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 1460–1470
- 67 **Loppnow H.** Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist (Berl)* 2001; 42: 13–27
- 68 **Senra L, Stalder R, Alvarez Martinez D, Chizzolini C, Boehncke WH, Brembilla NC.** Keratinocyte-Derived IL-17E Contributes to Inflammation in Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 1970–1980
- 69 **Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S.** Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* 2011; 34: 149–162
- 70 **Monin L, Gaffen SL.** Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10
- 71 **Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K.** Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 2009; 160: 319–324
- 72 **Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, Malefyt R de W.** Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 950–957
- 73 **Nogralas KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Cardinale I, Khatcherian A, Gonzalez J, Pierson KC, White TR, Pensabene C, Coats I, Novitskaya I, Lowes MA, Krueger JG.** Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008; 159: 1092–1102
- 74 **Krueger JG, Fretzin S, Suárez-Fariñas M, Haslett PA, Phipps KM, Cameron GS, McColm J, Katcherian A, Cueto I, White T, Banerjee S, Hoffman RW.** IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130
- 75 **Kirkham BW, Kavanaugh A, Reich K.** Interleukin-17A: A unique pathway in immune-mediated diseases: Psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology* 2014; 141: 133–142
- 76 **Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH.** The IL-17 family of cytokines in psoriasis: IL-17A and beyond. *Front Immunol* 2018; 9
- 77 **Gaffen SL.** Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 613–619
- 78 **Kurschus FC, Moos S.** IL-17 for therapy. *J Dermatol Sci* 2017; 87: 221–227

- 79 **Amatya N, Garg A V., Gaffen SL.** IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol* 2017; 38: 310–322
- 80 **Hartupée J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T.** IL-17 Enhances Chemokine Gene Expression through mRNA Stabilization. *J Immunol* 2007; 179: 4135–4141
- 81 **Hedrick MN, Lonsdorf AS, Shirakawa AK, Lee CCR, Liao F, Singh SP, Zhang HH, Grinberg A, Love PE, Hwang ST, Farber JM.** CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2317–2329
- 82 **Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, De Sauvage FJ, Gurney AL.** Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278: 1910–1914
- 83 **Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ.** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233–240
- 84 **Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, Bruce AT.** Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *J Immunol* 2011; 187: 490–500
- 85 **Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, Ogg GS.** IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol* 2012; 21: 104–110
- 86 **Akimzhanov AM, Yang XO, Dong C.** Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem* 2007; 282: 5969–5972
- 87 **Soderstrom C, Berstein G, Zhang W, Valdez H, Fitz L, Kuhn M, Fraser S.** Ultra-Sensitive Measurement of IL-17A and IL-17F in Psoriasis Patient Serum and Skin. *AAPS J* 2017; 19: 1218–1222
- 88 **Papp KA, Reich K, Paul C, Blauvelt A, Baran W, Bolduc C, Toth D, Langley RG, Cather J, Gottlieb AB, Thaçi D, Krueger JG, Russell CB, Milmont CE, Li J, Klekotka PA, Kricorian G, Nirula A.** A prospective phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2016; 175: 273–286
- 89 **Glatt S, Baeten D, Baker T, Griffiths M, Ionescu L, Lawson ADG, Maroof A, Oliver R, Popa S, Strimenopoulou F, Vajjah P, Watling MIL, Yeremenko N, Miossec P, Shaw S.** Dual IL-17A and IL-17F neutralisation by bimekizumab in

- psoriatic arthritis: Evidence from preclinical experiments and a randomised placebo-controlled clinical trial that IL-17F contributes to human chronic tissue inflammation. *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 523–532
- 90 **Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Seon HC, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C.** Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 2007; 204: 1509–1517
- 91 **Xu M, Dong C.** IL-25 in allergic inflammation. *Immunol Rev* 2017; 278: 185–191
- 92 **Gaffen SL.** Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 556–567
- 93 **Hvid M, Vestergaard C, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Deleuran M.** IL-25 in atopic dermatitis: A possible link between inflammation and skin barrier dysfunction. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 150–157
- 94 **Deleuran M, Hvid M, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Vestergaard C.** IL-25 induces both inflammation and skin barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy* 2012; 96: 45–49
- 95 **Batalla A, Coto E, González-Lara L, González-Fernández D, Gómez J, Aranguren TF, Queiro R, Santos-Juanes J, López-Larrea C, Coto-Segura P.** Association between single nucleotide polymorphisms IL17RA rs4819554 and IL17E rs79877597 and Psoriasis in a Spanish cohort. *J Dermatol Sci* 2015; 80: 111–115
- 96 **Senra L, Mylonas A, Kavanagh RD, Fallon PG, Conrad C, Borowczyk-Michalowska J, Wrobel LJ, Kaya G, Yawalkar N, Boehncke WH, Brembilla NC.** IL-17E (IL-25) Enhances Innate Immune Responses during Skin Inflammation. *J Invest Dermatol* 2019; 139: 1732-1742.e17
- 97 **Rickel EA, Siegel LA, Yoon B-RP, Rottman JB, Kugler DG, Swart DA, Anders PM, Tocker JE, Comeau MR, Budelsky AL.** Identification of Functional Roles for Both IL-17RB and IL-17RA in Mediating IL-25-Induced Activities. *J Immunol* 2008; 181: 4299–4310
- 98 **Borowczyk J, Buerger C, Tadjrischi N, Drukala J, Wolnicki M, Wnuk D, Modarressi A, Boehncke W-H, Brembilla NC.** IL-17E (IL-25) and IL-17A differentially affect the functions of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2020;
- 99 **Xu M, Lu H, Lee YH, Wu Y, Liu K, Shi Y, An H, Zhang J, Wang X, Lai Y, Dong C.** An Interleukin-25-Mediated Autoregulatory Circuit in Keratinocytes Plays a Pivotal Role in Psoriatic Skin Inflammation. *Immunity* 2018; 48: 787-798.e4
- 100 **Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A,**

- Fusenig NE.** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106: 761–771
- 101 **Roche.** Cell Proliferation Reagent WST-1. *Cell Prolif* 2007; 1: 1–4
- 102 **Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, Simon A.** Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2009; 18: 143–151
- 103 **Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Fumagalli M, Carlino C, Corsetto PA, Scaccabarozzi D, Calvieri S, Gismondi A, Taramelli D, Dell’Agli M.** HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 1–12
- 104 **Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, Bowman EP, Krueger JG.** Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1207–1211
- 105 **Griffiths CEM.** The immunological basis of psoriasis. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2003; 17: 1–5
- 106 **Martin DA, Towne JE, Kricorian G, Klekotka P, Gudjonsson JE, Krueger JG, Russell CB.** The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: Preclinical and clinical findings. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 17–26
- 107 **Huang T, Lin X, Meng X, Lin M.** Phosphoinositide-3 kinase/protein kinase-B/mammalian target of rapamycin pathway in psoriasis pathogenesis. A potential therapeutic target? *Acta Derm Venereol* 2014; 94: 371–379
- 108 **Chamcheu JC, Chaves-Rodriguez MI, Adhami VM, Siddiqui IA, Wood GS, Jack Longley B, Mukhtar H.** Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR $\beta/\delta$  in human psoriasis and imiquimodinduced murine psoriasiform dermatitis model. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 854–856
- 109 **Mavropoulos A, Rigopoulou EI, Liaskos C, Bogdanos DP, Sakkas LI.** The role of p38 mapk in the aetiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 569751
- 110 **Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L.** The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 2005; 152: 37–42
- 111 **Chamcheu JC, Chaves-Rodriguez MI, Adhami VM, Siddiqui IA, Wood GS, Jack Longley B, Mukhtar H.** Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR $\beta/\delta$  in human psoriasis and imiquimodinduced murine psoriasiform dermatitis model. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 854–856

- 112 **Mitra A, Raychaudhuri SKSP, Raychaudhuri SKSP.** IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Cytokine* 2012; 60: 38–42
- 113 **Datta-Mitra A, Mitra A, Ray R, Raychaudhuri SP, Kundu-Raychaudhuri S.** 1,25-dihydroxyvitamin D3-3-bromoacetate, a novel vitamin D analog induces immunosuppression through PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 744–751
- 114 **Pankow S, Bamberger C, Klippel A, Werner S.** Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase. *J Cell Sci* 2006; 119: 4033–4046
- 115 **Zhang M, Zhang X.** The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2019; 311: 83–91
- 116 **Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857–868
- 117 **Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ.** Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998; 12: 3499–3511
- 118 **Lizcano JM, Alessi DR.** The insulin signalling pathway. *Curr Biol* 2002; 12: R236-8
- 119 **Xu L, Len H, Shi X, Ji J, Fu J, Len H.** MiR-155 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by PTEN signaling pathway in the psoriasis. *Biomed Pharmacother* 2017; 90: 524–530
- 120 **Li C, Xiao L, Jia J, Li F, Wang X, Duan Q, Jing H, Yang P, Chen C, Wang Q, Liu J, Shao Y, Wang N, Zheng Y.** Cornulin Is Induced in Psoriasis Lesions and Promotes Keratinocyte Proliferation via Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathways. *J Invest Dermatol* 2019; 139: 71–80
- 121 **Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, Kunz S, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R.** The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 2009; 39: 3570–3581
- 122 **Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W.** Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445: 648–651
- 123 **Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W,**

- Sabat R.** IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- $\gamma$  are not. *J Mol Med* 2009; 87: 523–536
- 124 **Kim BE, Bin L, Ye YM, Ramamoorthy P, Leung DYM.** IL-25 Enhances HSV-1 replication by inhibiting filaggrin expression, and acts synergistically with TH2 cytokines to enhance hsv-1 replication. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 2678–2685
- 125 **Pfaff CM, Marquardt Y, Fietkau K, Baron JM, Lüscher B.** The psoriasis-associated IL-17A induces and cooperates with IL-36 cytokines to control keratinocyte differentiation and function. *Sci Rep* 2017; 7: 15631
- 126 **Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R.** IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1309–1323
- 127 **Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CEM, Papp K, Puig L, Nakagawa H, Spelman L, Sigurgeirsson B, Rivas E, Tsai TF, Wasel N, Tying S, Salko T, Hampele I, Notter M, Karpov A, Helou S, Papavassilis C.** Secukinumab in plaque psoriasis - Results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* 2014; 371: 326–338
- 128 **Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, Langley RG, Luger T, Ohtsuki M, Reich K, Amato D, Ball SG, Braun DK, Cameron GS, Erickson J, Konrad RJ, Muram TM, Nickoloff BJ, Osuntokun OO, Secrest RJ, Zhao F, Mallbris L, Leonardi CL.** Phase 3 trials of ixekizumab in moderate-to-severe plaque psoriasis. *N Engl J Med* 2016; 375: 345–356
- 129 **Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li J, Russell CB, Thompson EHZ, Baumgartner S.** Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 2012; 366: 1181–1189
- 130 **Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, Lahfa M, Claudy A, Griffiths CEM.** Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: A randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2001; 145: 438–445
- 131 **Frigerio E, Colombo MD, Franchi C, Altomare A, Garutti C, Altomare GF.** Severe psoriasis treated with a new macrolide: Everolimus. *Br J Dermatol* 2007; 156: 372–374
- 132 **Ormerod AD, Shah SAA, Copeland P, Omar G, Winfield A.** Treatment of psoriasis with topical sirolimus: Preclinical development and a randomized, double-blind trial. *Br J Dermatol* 2005; 152: 758–764

## **9 Anhang**

### **9.1 Nutzungsgenehmigung von Abbildungen aus Fremdquellen**

Nutzungsgenehmigungen der Autoren von Abbildungen aus Fremdquellen wurden eingeholt.

## 10 Publikationsverzeichnis

**Borowczyk J, Buerger C, Tadjrischi N, Drukala J, Wolnicki M, Wnuk D, Modarressi A, Boehncke W-H, Brembilla NC.** IL-17E (IL-25) and IL-17A differentially affect the functions of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.12.013>

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe hätte die Anfertigung dieser Arbeit niemals realisiert werden können:

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und Vermittlung an Frau Priv. Doz. Dr. phil. nat. Claudia Bürger am Universitätsklinikum Frankfurt.

An Frau Priv. Doz. Dr. phil. nat. Claudia Bürger, der Betreuerin meiner Dissertation, gilt mein größter Dank, welche mir die Erforschung dieses spannenden Themas ermöglichte. Auch für die gemeinsamen Auswertungen meiner Daten und mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken. Ihre wertvollen Hilfestellungen, fachliche und persönliche Unterstützung haben zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ich danke Victoria Lang und Sandra Diehl für deren Hilfe, Geduld und Motivation bei meinen experimentellen Versuchen und die liebevolle Unterstützung während meiner Laborzeit.

Ich danke auch meinen Mitdoktoranden aus dem immunologischen Labor Angelina Dmitriev, Antonio Ferreri und Diyar Nayir für die humorvolle Arbeitsatmosphäre vor und nach der Laborarbeit.

Mein besonders herauszustellender Dank gilt meinem Freund Scherwin Zanjani. Ich danke Dir für Deine Aufmunterungen und unendliche Unterstützung meine Dissertation zu vollenden. Du hast mir stets zur Seite gestanden und immer Verständnis gehabt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, denen ich diese Arbeit widme. Ich danke Euch für Eure uneingeschränkte liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Lebenswegs. Nur für Euch habe ich die vorliegende Studie begonnen und beendet.

## **13 Tabellarischer Lebenslauf**

*Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.*



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6884-4



9 17 8 3 8 3 5 11 9 6 8 8 4 4 1