

Aus der Klinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
METHANOL, ETHANOL, DIMETHYLSULFOXID UND
DIMETHYLISOSORBID
AUF DIE VITALITÄT UND FÄHIGKEIT ZUR
ZYTOKINPRODUKTION
HUMANER KERATINOZYTEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

INGA FRIEDERIKE STRELOW

aus Rotenburg/Wümme

Kiel (2009)

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gläser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.01.2010

gez:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	4
2.1	Zellkultur	4
2.2	Neutralrottest	4
2.3	Untersuchung der Interleukin (IL)-8-Genexpression	6
2.3.1	Vorbereitung	6
2.3.2	RNA-Extraktion	7
2.3.3	Reverse Transkription (RT)	8
2.3.4	Realtime-RT-PCR-Amplifikation	9
2.4	Statistische Auswertung	10
3	Ergebnisse	12
3.1	Nachweis der Zytotoxizität der Substanzen Methanol, Ethanol, DMSO und DMI auf humane Keratinozyten mittels Neutralrottest	12
3.2	Nachweis der IL-8-mRNA-Expression in TNF- α - stimulierten humanen Keratinozyten unter Zusatz verschiedener Detergentien mittels Realtime-RT-PCR	18
4	Diskussion	23
5	Zusammenfassung	29
6	Literaturverzeichnis	31
7	Danksagung	35
8	Lebenslauf	36

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementär-Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylfumarat
DMI	Dimethylisorbid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive toxische Konzentration
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GS-DMS	1,2-Dimethoxycarbonylethyl-Glutathion
d. h.	das heißt
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL-8	Interleukin-8
MMF	Monomethylfumarat
MW	Mittelwert
NK	Negativkontrolle
NF κ B	Nukleärer Faktor kappa B
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Positivkontrolle
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TC	Testsubstanz
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u. a.	unter anderem
v/v	Volumenprozent (Volumen in Volumen)

1 Einleitung

Die Psoriasis vulgaris ist eine weit verbreitete, chronisch verlaufende Hauterkrankung, bei der es im Rahmen einer kutanen Entzündungsreaktion zu epidermaler Hyperproliferation und gestörter Zelldifferenzierung kommt. Die Prävalenz in Deutschland beträgt etwa 2% (Mrowietz und Reich, 2009). Aufgrund dieser Häufigkeit stellen die Gesamtkosten der Erkrankung eine hohe volkswirtschaftliche Belastung dar. Weiterhin ist die Erkrankung mit erheblicher psychosozialer Belastung verbunden (Schmid-Ott et al., 2005; Dubertret et al., 2006).

Die Ätiologie der Psoriasis ist nach wie vor weitgehend unklar. Eine genetische Prädisposition gilt als gesichert. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Psoriasis wird der Antigen-vermittelten T-Zell-Aktivierung zugeschrieben, so dass bei der Behandlung der Erkrankung u. a. verschiedene immunsupprimierende bzw. immunmodulierende Therapieansätze wie die Gabe von Methotrexat oder Ciclosporin zum Einsatz kommen (Lowe et al., 2007).

Abhängig vom Zeitpunkt der Erstmanifestation werden 2 Krankheitstypen unterschieden: Die Typ 1 - Psoriasis manifestiert sich vor dem 40. Lebensjahr. Die Familienanamnese ist in den meisten Fällen positiv, des Weiteren ist eine HLA-Assoziation bekannt (HLA-Cw6 und -DR7) (Henseler, 1998; Elder et al., 2001).

Bei der Typ 2 - Psoriasis liegt die Erstmanifestation jenseits des 40. Lebensjahres, die Familienanamnese ist negativ, HLA-Assoziationen sind nicht bekannt.

Der Verlauf der Psoriasis ist chronisch und schubweise, das klinische Bild facettenreich. Es beinhaltet die exanthematische Form: „Psoriasis guttata“, diese ist oft infektassoziiert und nicht selten erster Psoriasis Schub; und die chronisch-stationäre Form mit großflächigen erythrosquamösen Plaques. Prädilektionsstellen sind hierbei die Extremitätenstreckseiten, der Umbilikal- sowie der Sakralbereich und das Kapilitium. Als Maximalvariante kann es zur psoriatischen Erythrodermie kommen.

Als Sonderform gilt die Psoriasis pustulosa mit der Bildung steriler Pusteln, welche bei schwerem Verlauf zu regelrechten Eiterseen konfluieren können.

Für die Behandlung der Psoriasis werden Medikamente topisch oder systemisch eingesetzt oder die erkrankte Haut wird mit ultraviolettem Licht behandelt.

Die antipsoriatische Wirkung von Fumarsäureestern ist seit längerem bekannt (Schweckendiek, 1959). Als einziges Präparat ist seit 1994 Fumaderm[®] zugelassen. Fumaderm[®] enthält Dimethylfumarat (DMF) und drei Ethylfumaratsalze, wobei DMF als eigentlicher Wirkstoff gilt. Die klinische Wirkung und die Effektivität von Fumarsäureestern sind durch Studien dokumentiert (Altmeyer et al., 1994; Mrowietz et al., 1998), die langfristige Sicherheit der Fumarsäureester-Therapie ist belegt (Altmeyer et al., 1996; Hoefnagel et al., 2003). Der exakte Wirkmechanismus ist jedoch weiterhin nicht vollständig erforscht (Mrowietz und Asadullah, 2005).

Nachdem es möglich geworden ist, DMF als Monosubstanz für die Therapie zu entwickeln, ist neben der Psoriasis die multiple Sklerose als wichtige Indikation hinzugekommen. Mit dem Präparat BG-12 (Panaclar[®]) wurde in einer Phase 2-Studie die Wirksamkeit und Verträglichkeit von DMF bei der „relapsing, remitting“ Form der multiplen Sklerose untersucht. Hierbei zeigte sich eine gegenüber der Placebo-Gruppe signifikante Verbesserung der Symptome und ein Rückgang der Gadolinium-verstärkten Herde bei der Magnetresonanztomographie (Kappos et al., 2008).

Von großer Bedeutung für die Wirkung von DMF ist seine Aufnahme in den Körper nach oraler Gabe der magensaftresistenten Tabletten. Hier konnte durch Untersuchungen an gesunden Probanden gezeigt werden, dass DMF sehr schnell an Glutathion bindet und zu einem stabilen Adukt führt (1,2-Dimethoxycarbonylethyl-Glutathion, GS-DMS). In mehreren weiteren Schritten wird GS-DMS dann zu seiner entsprechenden Merkaptursäure umgewandelt, die im Urin in großer Menge nachgewiesen werden kann (Rostami-Yazdi et al., 2009).

In den Untersuchungen zur Wirkung von Fumarsäureestern wurden zumeist *in vitro*-Systeme eingesetzt und DMF im Vergleich zu seinem ersten Hydrolyseprodukt und wichtigstem Metaboliten Monomethylfumarat (MMF) und freier Fumarsäure eingesetzt. Dabei konnten verschiedene Wirkungen von Fumarsäureestern beschrieben werden. In ersten Versuchen zeigten de Jong et al. (1996) eine Veränderung des Profils von Zytokinen durch Zusatz von MMF zu stimulierten T-Zellen. Im Weiteren wurde nachgewiesen, dass DMF die Expression von Adhäsionsmolekülen auf humanen Endothelzellen modulieren kann (Vandermeeren et al., 1997). Anschließend wurde der Frage nachgegangen, wie die Effekte von

Fumarsäureestern auf Zytokinfreisetzung und Expression von Adhäsionsmolekülen reguliert werden. Dabei zeigte sich eine direkte Beeinflussung des nukleären Transkriptionsfaktors NFκB (nukleärer Faktor kappa B) in verschiedenen Zellen (Vandermeeren et al., 2001; Loewe et al., 2001; Loewe et al., 2002).

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den meisten wissenschaftlichen Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Fumarsäureestern um *in vitro*-Versuche handelt, müssen die entsprechenden Substanzen in dafür geeigneten Lösungsmitteln gelöst werden. Da DMF nicht wasserlöslich ist, müssen für *in vitro*-Untersuchungen alternative Lösungsmittel verwendet werden. In allen bisher in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Arbeiten zu *in vitro*-Wirkungen von Fumarsäureestern wurden unterschiedliche Lösungsmittel verwendet. Bei der Mehrzahl der Versuche wurden Methanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Jedoch können die aufgrund pharmakologischer Überlegungen theoretisch anwendbaren Lösungsmittel für Substanzen wie DMF unerwünschte Effekte auf die untersuchten Zellen haben. Dies könnte die Aussagekraft der entsprechenden Experimente in Frage stellen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Eignung der Lösungsmittel Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxid und Dimethylisobutanol für zukünftige *in vitro*-Versuche mit Fumarsäureestern zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die zur Durchführung dieser Arbeit benötigten Keratinozyten wurden aus humanem Vorhautgewebe gewonnen (PromoCell, Heidelberg). Es wurden Zellen der 4. - 6. Passage verwendet, die zunächst in Kulturflaschen (75 cm², Sarstedt, Nürnbrecht) bis zur Subkonfluenz gezüchtet wurden. Als Standardmedium diente „Keratinocyte Growth Medium“, das mit entsprechendem „Supplement-Mix“ des Herstellers versetzt wurde (beides PromoCell).

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkraumbank (LaminAir[®], Heraeus, Hanau) durchgeführt, die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, in einem Inkubator (Labotect, Göttingen) bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

2.2 Neutralrottest

Um den unspezifischen zytotoxischen Effekt der einzelnen Lösungsmittel auf humane Keratinozyten zu untersuchen, wurde der Neutralrottest (Borenfreund und Puerner, 1985) durchgeführt.

Dabei handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest, der darauf basiert, dass sich Neutralrotfarbstoff in den Lysosomen von Zellen mit intakter Zellmembran anreichert. Abgestorbene und membrangeschädigte Zellen können den Farbstoff weder akkumulieren, noch wird dieser bei den Waschvorgängen zurückgehalten.

Das Ausmaß der Anfärbbarkeit geht somit mit der Vitalität der Zellen einher und ist weitergehend ein Maß für die Toxizität der Substanzen, denen die Zellen ausgesetzt waren.

Zunächst wurden Keratinozyten in einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Vertiefung in 96-Loch-Platten (Sarstedt) ausgesät. Es wurden jeweils 200 µl Standardmedium pro Vertiefung verwendet.

24 Stunden nach Inkubationsbeginn wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit gepufferter, isotonischer Salzlösung (Phosphate Buffered Saline (PBS), Life Technologies, Karlsruhe) den vier verschiedenen Lösungsmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt und weitere 24 Stunden inkubiert.

Es wurden die Lösungsmittel Methanol (J. T. Baker, Deventer, Niederlande), Ethanol (Baker), Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, München) und Dimethylisobutyl (DMI, Fluka, Buchs, Schweiz) jeweils in den Konzentrationen 0,2%; 0,5%; 1%; 2% und 10% (v/v) verdünnt in Standardmedium verwendet.

Von jeder Konzentration wurden in einem Volumen von jeweils 200 μ l 8 Proben pro Platte aufgetragen, weiterhin 8 Positivkontrollen (Zellen in Standardmedium, die keinem Lösungsmittel ausgesetzt waren, aber später mit Neutralrotmedium versetzt wurden) und 8 Negativkontrollen (Zellen, die weder Lösungsmittel noch Neutralrotmedium, sondern ausschließlich Standardmedium ausgesetzt waren).

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Vertiefungen erneut mit 200 μ l PBS gewaschen.

Mit Ausnahme der Negativkontrollen wurde nun in alle Vertiefungen 100 μ l Neutralrotmedium (Neutralrot-Farbstoff, Sigma) pipettiert. Die Negativkontrollen wurden erneut nur mit Standardmedium versetzt.

Die Neutralrotgebrauchslösung (Konzentration: 100 μ g/ml) wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn aus der Stammlösung (Neutralrotfarbstoff in HPLC-Wasser gelöst mit einer Konzentration von 10 mg/ml) hergestellt und vor dem Verwenden sterilfiltriert (0,2 μ m, Sartorius, Göttingen).

Nach einer Inkubationszeit von 2 - 3 Stunden bei Raumtemperatur wurde jede Vertiefung einem Waschvorgang mit 200 μ l 1%-Formaldehyd/1%-Calciumchlorid-Lösung (v/v; beides Fluka) unterzogen.

Der von den lebenden Zellen aufgenommene Farbstoff konnte durch 10 minütiges Schütteln in 1%-Essigsäure/50%-Ethanol-Lösung (100 μ l pro Kavität) (beides J.T. Baker) im Schüttelmischer TPM-2 (Sarstedt) extrahiert und spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen 405 nm mit einem ELISA Reader (Tecan Sunrise, Leipzig) bestimmt werden.

Mit jedem Lösungsmittel wurden 8 - 13 unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Zellvitalität wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellvitalität [\%]} = (\text{OD TC} - \text{OD NK}) \times 100 / (\text{OD PK} - \text{OD NK})$$

OD Optische Dichte, TC Testsubstanz, PK Positivkontrolle, NK Negativkontrolle

Es wurde zunächst mittels ansatzspezifischer Positivkontrolle und Negativkontrolle die optische Dichte des einzelnen Ansatzes errechnet und anschließend aus allen Proben der Mittelwert bestimmt.

Die mittlere effektive toxische Konzentration EC_{50} wurde graphisch ermittelt.

2.3 Untersuchung der Interleukin (IL)-8-Genexpression

2.3.1 Vorbereitung

Interleukin (IL)-8 ist ein Zytokin mit proinflammatorischen und wachstumsstimulierenden Eigenschaften. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass es unterschiedlichste Funktionen von Keratinozyten beeinflusst (Tuschil et al., 1992; Kemény et al., 1994). Es wird weiterhin angenommen, dass IL-8 eine entscheidende pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der Hauptsymptome der Psoriasis (Leukozyteninfiltration und epidermale Hyperproliferation) spielt (Schulz et al., 1993). Da die IL-8-Expression humaner Keratinozyten durch $TNF-\alpha$ induziert wird, kann eine entsprechende Zellstimulation als Modell dienen, einen Aspekt des Pathomechanismus der Psoriasis *in vitro* nachzuvollziehen. Dieses Experiment sollte daher repräsentativ untersuchen, ob und auf welche Art und Weise die $TNF-\alpha$ induzierte IL-8-Expression durch Lösungsmittel beeinflusst wird.

Zu Beginn wurde ein konfluent Monolayer humaner Keratinozyten aus einer Kulturflasche (75 cm², Sarstedt) auf 2 12-Loch-Platten (Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen) gleichmäßig ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C (5% CO₂) inkubiert. Nach einem anschließenden Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen nun über weitere 24 Stunden den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol, DMSO und DMI in den

Konzentrationen 0,2%, 1% und 10% (v/v) ausgesetzt. Die Verdünnungsreihen wurden jeweils kurz vor Beginn des Versuchs hergestellt, hierfür wurde das jeweilige Lösungsmittel mit „Keratinocyte Growth Medium“ der Firma Promocell verdünnt (Standardmedium) und jeweils 2 ml pro Vertiefung appliziert.

Pro Platte wurde jeweils ein Lösungsmittel untersucht, von jeder Konzentration wurden 2 Proben pro Platte aufgetragen, weiterhin 2 Positivkontrollen (Inkubation in Standardmedium ohne Lösungsmittlexposition, jedoch später Stimulation mit TNF- α) und 2 Negativkontrollen (weder Lösungsmittlexposition, noch TNF- α -Stimulation).

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C (5% CO₂) wurden die Zellen einem erneuten Waschvorgang mit PBS unterzogen und anschließend (mit Ausnahme der Negativkontrollen) mit TNF- α (Sigma) stimuliert. Hierzu wurde die TNF- α -Lösung zuvor mit Standardmedium in einer Endkonzentration von 100 ng/ml hergestellt. Pro Vertiefung wurden davon anschließend jeweils 2 ml appliziert. Die Stimulationsdauer betrug 2 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂.

Anschließend wurden die Überstände in 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) pipettiert; die Zellen wurden der RNA-Isolation zugeführt.

2.3.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde nach der Chomczynski-Sacchi-Methode (Ribaud et al., 2001) durchgeführt. Es wurde TRIzol[®]-Lösung (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet und nach den Empfehlungen des Herstellers verfahren: Zunächst wurden pro Vertiefung jeweils 0,5 ml Trizoldenaturierungslösung appliziert. Die Proben wurden durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und die Lösung in 1,5 ml-Reagenzgefäße (Eppendorf) überführt.

Nach Zugabe von 100 μ l Chloroform (Sigma) wurden die Proben für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und weitere 2 - 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde dieses Gemisch für 15 min bei 10 000 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei 4 °C zentrifugiert (MinifugeRF, Heraeus).

Nach der Zentrifugation zeigten sich 3 Phasen: In der unteren roten Phase befand sich das Phenol-Chloroform-Gemisch, in der milchigen Interphase die DNA und in der oberen klaren Phase die RNA.

Diese wurde vorsichtig abpipettiert und mit 250 μ l Isopropanol (J.T. Baker) gefällt. Die Proben wurden für 30 s kräftig geschüttelt und nach 7 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 15 Minuten bei 10 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die RNA-Pellets mit jeweils 500 μ l eiskaltem 75%-Ethanol (J.T. Baker) gewaschen. Nach kurzem Durchmischen (Vortex) erfolgte die erneute Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 8000 rpm (4 °C).

Nun wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, ein verbleibender Rest ggf. mittels kleiner Pipette abgenommen und die Proben 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Im Anschluss wurde den Proben 10 - 15 μ l 25%-Formamid (je nach Pelletgröße) (Sigma) hinzugefügt und diese 10 Minuten im Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf) bei 56 °C inkubiert.

Die Konzentration der auf diese Weise gewonnenen RNA wurde spektrometrisch am Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Zur Messung, die gegen eine Wellenlänge von 260 nm erfolgte, wurden UVette[®]-Küvetten der Firma Eppendorf verwendet.

Die präparierte RNA wurde im Anschluss revers transkribiert (RT) und per Polymerasekettenreaktion (PCR = Polymerase chain reaction) analysiert bzw. zunächst bei -70 °C gelagert.

2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Je nach dafür benötigter Menge an RNA-Formamid-Lösung wurden 1 μ g bzw. 0,5 μ g RNA in cDNA umgeschrieben. Es galt maximal 2,5 μ l RNA-Lösung je Ansatz zu verwenden. Die Beeinträchtigung der Qualität des RT-Produktes durch einen zu hohen Formamidanteil sollte auf diese Weise so gering wie möglich gehalten werden. Zur Umschreibung wurden sterile 0,5 ml-Reagenzgefäße der Firma Eppendorf sowie das Kit SuperScript II (Invitrogen) verwendet. Die reverse Transkription wurde nach

dem Protokoll des Herstellers im TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als RT-Kontrolle wurde reines HPLC-Wasser verwendet. Die so gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.3.4 Realtime-RT-PCR-Amplifikation

Die Interleukin (IL)-8-mRNA-Expression in Abhängigkeit der jeweiligen Lösungsmittlexposition wurde mittels Realtime-RT-PCR-Amplifikation untersucht. Als interne Kontrolle wurde weiterhin die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Expression bestimmt; dabei handelt es sich um ein „Housekeeping“-Gen humaner Zellen. Somit war es möglich die relative IL-8-mRNA-Expression zu bestimmen sowie neben der Messung der Konzentration der isolierten RNA Aussagen über die Vitalität und die vergleichbare mRNA-Konzentration der Zellen durch Bestimmung ihrer GAPDH-Expression zu machen.

Die Untersuchungen wurden in einem Fluoreszenz-Thermocycler nach Anweisung des Herstellers durchgeführt (LightCycler[®], Roche, Mannheim). Bei dieser Technik wird das in jedem PCR-Zyklus entstehende fluoreszenzmarkierte Amplifikationsprodukt kontinuierlich gemessen.

Als Amplifikations-Kit diente SYBR[®]-Premix (Takara, Shiga, Japan), dabei wurde jeweils 1 µl cDNA mit 5 µl SYBR[®]-Premix, 3,6 µl *Aqua destillata* und je 0,2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer versetzt. Die Proben wurden in LightCycler[®]-Kapillaren der Firma Roche pipettiert und bei 600 g zentrifugiert. Die anschließende PCR erfolgte als sogenannte Touch-down-PCR, d. h. die Annealing-Temperatur wurde in den ersten 6 Zyklen jeweils um 1 °C herabgesetzt und dann beibehalten.

Nach initialer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden erfolgte die Amplifikation über 45 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete 5 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 5 bzw. 10 Sekunden (bei IL-8- bzw. GAPDH-Untersuchung) Annealing bei initial 66 °C (pro Zyklus wurde die Temperatur bis zum Erreichen der Zieltemperatur von 60 °C um 1 °C herabgesetzt), sowie 15 Sekunden Polymerisierung bei 72 °C. Die SYBR Green I[®] Fluoreszenz wurde bei 72 °C am Ende jedes Zyklus gemessen. Nach jedem Lauf wurden Schmelzkurven erstellt (Kühlung der Proben auf 65 °C für 15 Sekunden,

anschließend Erhitzen um 0,1 °C/s bis 95 °C mit kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz), um die Spezifität des amplifizierten Transkriptes zu überwachen.

Es wurden Primer der Firma Sigma verwendet. Die Sequenzen lauteten wie folgt:

GAPDH:	Vorwärts	5'-CCAGCCGAGCCACATCGCCGCTC-3'
	Rückwärts	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'
IL-8:	Vorwärts	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTCGC-3'
	Rückwärts	5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTC-3'.

Bei der Quantifizierung der PCR-Produkte eliminiert die verwendete Software zunächst in jedem Ansatz die Hintergrund-Fluoreszenz der ersten Zyklen. Bei jeder Probe wird im Rahmen der Amplifikation dann das Erreichen einer Fluoreszenz-Schwelle von 5% der vollen Skala ermittelt, dieser Wert korreliert negativ mit dem Logarithmus der initialen Template-Konzentration. Die relative mRNA-Expression des spezifischen Gens wurde später durch Division mit dem entsprechenden GAPDH-Transkriptionslevel errechnet.

2.4 Statistische Auswertung

Die Versuche zur Zytotoxizitätsuntersuchung mittels Neutralrottest wurden in Abhängigkeit des Lösungsmittels acht- bis dreizehnfach unabhängig in 8-fach-Ansätzen durchgeführt.

Die Ermittlung der Gesamtmittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse erfolgte aus dem jeweiligen Mittelwert der 8-fach-Ansätze für jedes unabhängige Experiment mit Hilfe von Microsoft Excel. Unterschiede wurden bei entsprechender Verteilung der Daten mittels einseitigem t-Test auf statistische Signifikanz geprüft, wobei ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt wurde.

Zur Untersuchung der IL-8-Genexpression wurden 4 - 5 unabhängige Ansätze in Doppelwerten durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung der Ergebnisse wurden ebenfalls mit Hilfe von Microsoft Excel ermittelt. In Einzelfällen kam es bei den Messungen zu methodisch bedingten „Ausreißern“. Diese wurden nach

statistischer Prüfung (Sachs 1978) aus der Mittelwertbildung ausgeschlossen. Unterschiede wurden bei entsprechender Verteilung der Daten mittels zweiseitigem t-Test auf statistische Signifikanz geprüft, wobei ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Zytotoxizität der Substanzen Methanol, Ethanol, DMSO und DMI auf humane Keratinozyten mittels Neutralrottest

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Lösungsmittel Methanol, Ethanol, DMSO und DMI in Abhängigkeit der Konzentration wurde der Neutralrottest durchgeführt. Dieser Test basiert darauf, dass vitale Zellen Neutralrotfarbstoff akkumulieren. Zellen mit geschädigter Zellmembran besitzen diese Fähigkeit nicht, der Farbstoff wird hier ausgewaschen. Die Intensität der Anfärbung korreliert somit direkt mit der Vitalität der Zellen.

Nach 24 Stunden Stimulation der Keratinozyten mit den oben genannten Lösungsmitteln in den Konzentrationen 0,2%, 0,5%, 1%, 2% und 10% (v/v) wurde der Test durchgeführt und die Anfärbung mit Hilfe eines ELISA-Readers quantifiziert. Die Auswertung der Zellvitalität erfolgte im Vergleich zu den Zellen, die dem Neutralrotfarbstoff, jedoch keinem der Lösungsmittel ausgesetzt waren (Positivkontrolle).

Die Tabellen 1 - 4 zeigen die Auswirkungen der untersuchten Lösungsmittel auf die Zellvitalität in Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen.

Aus den erhobenen Daten konnte weiterhin die mittlere effektive toxische Konzentration (EC_{50}) jedes Lösungsmittels graphisch ermittelt werden, diese werden in den Abbildungen 1 - 4 verdeutlicht.

Tabelle 5 gibt einen zusammenfassenden Überblick der Ergebnisse des Neutralrottests, es werden die EC_{50} der einzelnen Lösungsmittel sowie die jeweiligen Konzentrationen mit einer Toxizität von weniger als 10% demonstriert.

Methanol zeigte in allen untersuchten Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln den geringsten Effekt auf die Zellvitalität der verwendeten humanen Keratinozyten, bei einer Konzentration von 10% (v/v) betrug diese im Mittel noch 72,3%, so dass die EC_{50} hier nicht erreicht wurde. Ein statistisch signifikanter Einfluss

auf die Zellvitalität zeigte sich ausschließlich bei einer Methanolkonzentration von 10% (v/v).

Methanolkonzentration (v/v)	MW [%]	SD [%]	p-Wert
0,2%	96,4	13,0	0,38
0,5%	101,7	16,2	0,73
1%	104,1	15,8	0,41
2%	99,4	14,5	0,88
10%	72,3	26,0	0,01

Tab. 1: Zellvitalität [%] humaner Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz Methanol.

Angegeben sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und p-Werte von insgesamt 13 unabhängigen Experimenten.

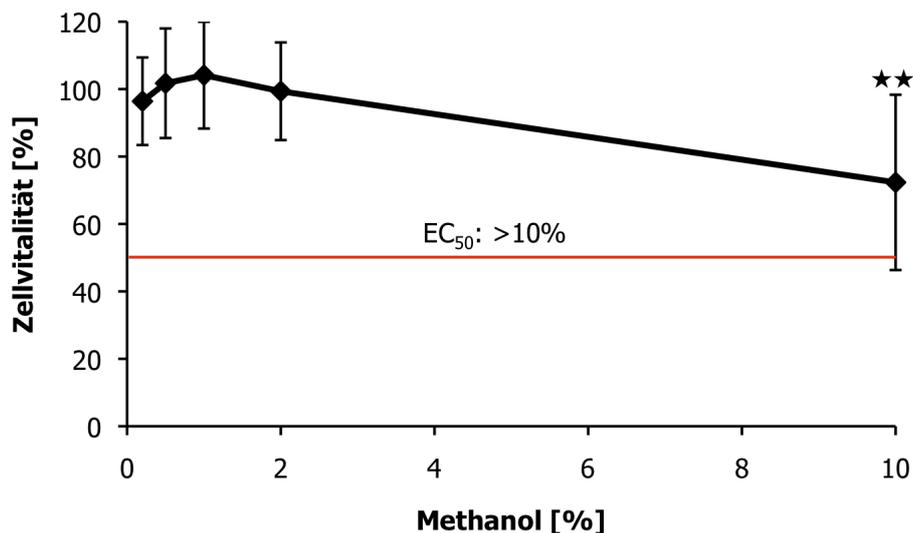


Abb. 1: Graphische Darstellung von Tabelle 1: Zellvitalität humaner Keratinozyten, die mit Methanol in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden.

Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittlexposition, jedoch Neutralrotfarbstoffapplikation), ** $p < 0,01$.

Ethanol hatte in Konzentrationen bis maximal 0,5% (v/v) einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die verwendeten Zellen, mit steigender Konzentration ließ sich

jedoch eine rasch zunehmende zytotoxische Wirkung darstellen. Bei einer Ethanolkonzentration von 2% war annähernd die mittlere effektive toxische Konzentration erreicht, die Zellvitalität entsprach hier 54,6%. Bei den Untersuchungen mit Ethanol zeigten sich in allen Konzentrationen >0,2% statistisch hoch-signifikante Einflüsse auf die Vitalität der Keratinozyten im Vergleich zur Kontrolle.

Ethanolkonzentration (v/v)	MW [%]	SD [%]	p-Wert
0,2%	94,1	7,4	0,06
0,5%	84,1	6,3	< 0,001
1%	75,4	16,9	< 0,001
2%	54,6	16,3	< 0,001
10%	20,1	6,6	< 0,001

Tab. 2: Zellvitalität [%] humaner Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz Ethanol.

Angegeben sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und p-Werte von insgesamt 8 unabhängigen Experimenten.

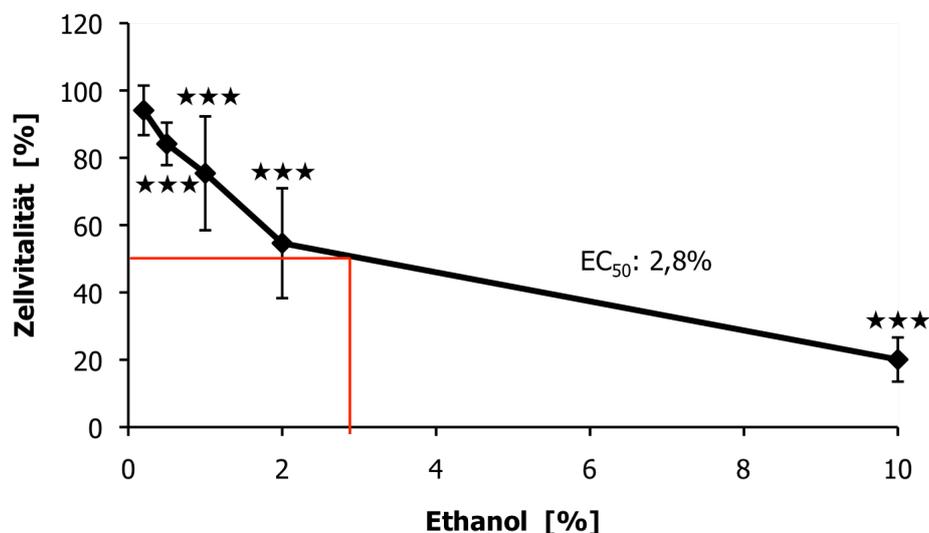


Abb. 2: Graphische Darstellung von Tabelle 2: Zellvitalität humaner Keratinozyten, die mit Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden.

Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittlexposition, jedoch Neutralrotfarbstoffapplikation), ***: $p < 0,001$.

DMSO führte in Konzentrationen bis 1% (v/v) zu einem sehr geringen Effekt auf die Vitalität der untersuchten Zellen. Die EC_{50} war bei einer Konzentration von 5,8% (v/v) erreicht, bei einer 10%-igen Lösung betrug die Zellvitalität lediglich noch 10,6%. Bei DMSO-Konzentrationen von 0,2%, 2% und 10% (v/v) wurde ein p-Wert von $<0,01$ erreicht.

DMSO-Konzentration (v/v)	MW [%]	SD [%]	p-Wert
0,2%	94,6	5,3	0,01
0,5%	99,2	6,1	0,67
1%	96,1	10,2	0,23
2%	86,5	10,7	$< 0,001$
10%	10,6	5,7	$< 0,001$

Tab. 3: Zellvitalität [%] humaner Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz DMSO.

Angegeben sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und p-Werte von insgesamt 10 unabhängigen Experimenten.

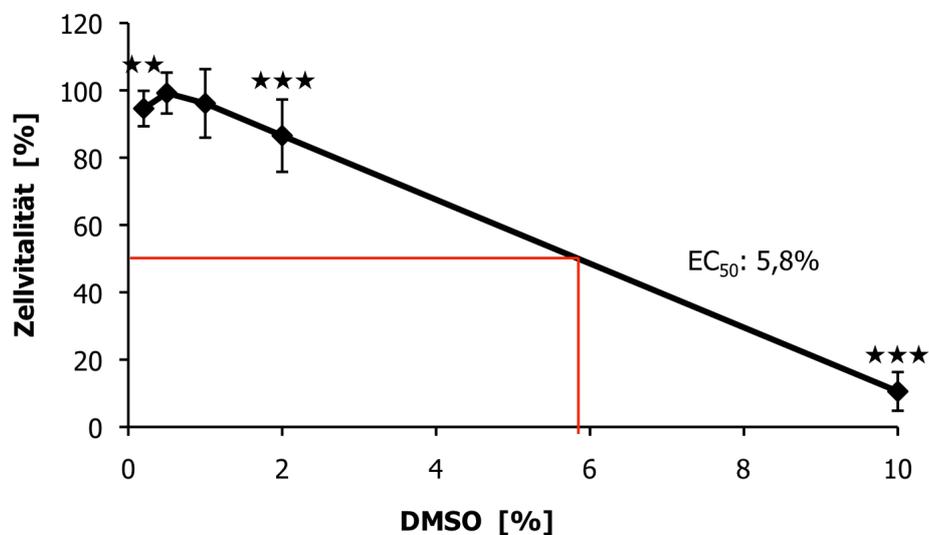


Abb. 3: Graphische Darstellung von Tabelle 3: Zellvitalität humaner Keratinozyten, die mit DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden.

Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittlexposition, jedoch Neutralrotfarbstoffapplikation), ★★: $p < 0,01$, ★★★: $p < 0,001$.

DMI hatte nur in den niedrigen Konzentrationen von 0,2% und 0,5% (v/v) einen geringen Einfluss auf die Vitalität der verwendeten humanen Keratinozyten, bei höheren Konzentrationen zeigte sich eine deutliche Zunahme der zytotoxischen Wirkung und die EC_{50} wurde bereits mit einer Konzentration von 1,4% (v/v) erreicht. Alle Konzentrationen oberhalb von 0,2% (v/v) zeigten signifikante Abweichungen zur Kontrolle.

DMI-Konzentration (v/v)	MW [%]	SD [%]	p-Wert
0,2%	94,4	14,3	0,27
0,5%	85,0	16,2	0,02
1%	66,2	17,3	< 0,001
2%	27,5	18,9	< 0,001
10%	7,6	3,4	< 0,001

Tab. 4: Zellvitalität [%] humaner Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz DMI.

Angegeben sind Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und p-Werte von insgesamt 9 unabhängigen Experimenten.

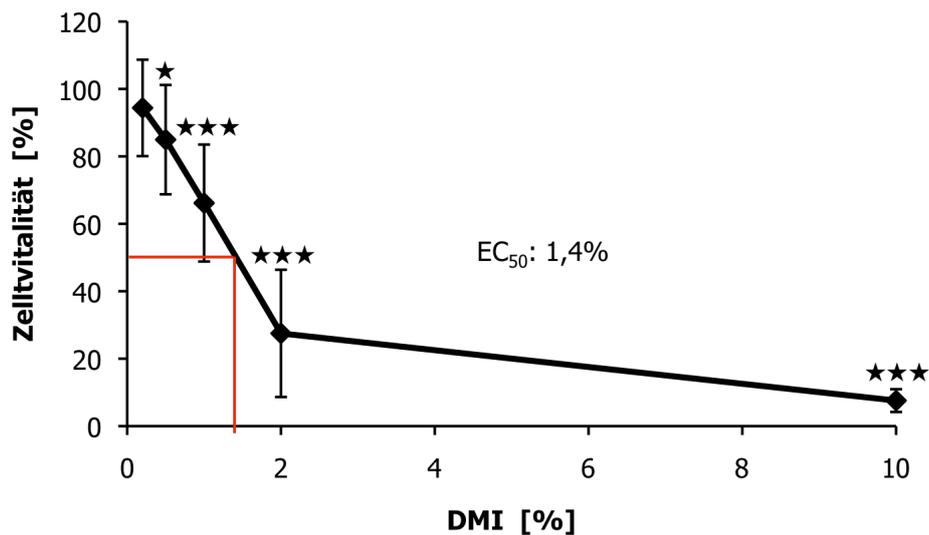


Abb. 4: Graphische Darstellung von Tabelle 4: Zellvitalität humaner Keratinozyten, die mit DMI in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden.

Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittelsexposition, jedoch Neutralrotfarbstoffapplikation), ★: $p < 0,05$, ★★★: $p < 0,001$.

Lösungsmittel	EC ₅₀	Toxizität $\leq 10\%$
Methanol [%]	> 10	< 3,6
Ethanol [%]	2,8	< 0,5
DMSO [%]	5,8	< 1
DMI [%]	1,4	< 0,4

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse des Neutralrottests zur vergleichenden Beurteilung des Einflusses verschiedener Lösungsmittel auf die Vitalität von humanen Keratinozyten.

Angegeben sind die graphisch ermittelte EC₅₀ der untersuchten Lösungsmittel, sowie deren jeweilige ebenfalls graphisch ermittelte maximale Konzentration mit einer Toxizität von weniger als 10%.

3.2 Nachweis der IL-8-mRNA-Expression in TNF- α - stimulierten humanen Keratinozyten unter Zusatz verschiedener Detergentien mittels Realtime-RT-PCR

Um den Einfluss der Lösungsmittel Methanol, Ethanol, DMSO und DMI auf die Fähigkeit der Keratinozyten zur Produktion von Zytokinen zu untersuchen, wurde die IL-8-mRNA-Expression der Zellen nach Stimulation mit TNF- α mittels Realtime-RT-PCR quantifiziert. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen in 12-Loch-Platten und nun folgender Behandlung mit unterschiedlichen Lösungsmittelkonzentrationen (0,2%, 1% und 10% (v/v)) über weitere 24 Stunden sowie anschließendem Waschvorgang mit PBS wurden die humanen Keratinozyten für 2 Stunden einer Stimulation mit TNF- α (100 ng/ml) unterzogen und anschließend die RNA gewonnen. Anschließend wurde die IL-8-mRNA-Expression mittels zuvor beschriebener Realtime-RT-PCR-Methode bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die nur mit TNF- α stimuliert wurden.

Durch den Abgleich mit der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Expression erfolgte die Bestimmung der relativen IL-8-Expression. Bei GAPDH handelt es sich um ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen, welches in allen humanen Zellen konstitutiv exprimiert wird. Somit war es möglich, durch Auswertung der GAPDH-Expression Aussagen über die Vergleichbarkeit der RNA-Konzentrationen sowie indirekt auch über die Vitalität der Zellen zu machen.

Bei Lösungsmittelkonzentrationen, für die keine nachweisbare GAPDH-Expression gemessen werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass in diesen Ansätzen keine ausreichende Konzentration bzw. Qualität von Zellen für die RNA-Extraktion vorlag. Es war daher in diesen Fällen nicht möglich, Aussagen über die IL-8-mRNA-Expression zu machen.

Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu den Zellen aus den Stimulationskontrollen, die weder mit einem Lösungsmittel noch mit TNF- α behandelt wurden (Negativkontrolle, wurde zur Berechnung gleich 1 gesetzt). Die statistische Analyse bezog sich hingegen jeweils auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittlexposition, jedoch TNF- α -Stimulation).

Die Tabellen 6 - 9 führen die Ergebnisse der durchgeführten Versuche auf, Abbildung 5 bietet einen zusammenfassenden Überblick.

Methanol induzierte in allen untersuchten Konzentrationen die relative IL-8-mRNA-Expression von TNF- α -stimulierten humanen Keratinozyten. Konzentrationsabhängig kam es im Vergleich zu Zellen, die mit TNF- α stimuliert wurden, jedoch keinem Lösungsmittel ausgesetzt waren, zu einer 1,2-fachen (0,2% v/v Methanol), einer 2,1-fachen (1% v/v Methanol) bzw. einer 2,5-fachen Induktion (10% v/v Methanol). Eine statistisch signifikante Induktion im Vergleich zur Positivkontrolle fand sich ausschließlich bei einer Methanolkonzentration von 10% ($p < 0,05$).

Behandlung der Zellen	MW	SD	p-Wert
Negativkontrolle	1,0	0,00	
Positivkontrolle	17,73	12,68	
0,2% (v/v) Methanol	20,50	16,75	0,291
1% (v/v) Methanol	37,52	25,45	0,065
10% (v/v) Methanol	44,47	31,47	0,026

Tab. 6: Relative IL-8-mRNA-Expression in humanen Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen.

Angegeben sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sowie die dazugehörigen p-Werte aus insgesamt 5 unabhängigen Versuchen im Doppelansatz. Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittlexposition, jedoch TNF- α -Stimulation).

Ethanol bewirkte in Konzentrationen von 0,2% und 1% (v/v) eine nicht-signifikante Suppression der IL-8-mRNA-Expression. Für eine Ethanolkonzentration von 10% ließen sich keine Werte ermitteln, da in diesen Ansätzen aufgrund der Zytotoxizität der Lösungsmittelkonzentration eine GAPDH-Expression nicht nachgewiesen werden konnte (*).

Behandlung der Zellen	MW	SD	p-Wert
Negativkontrolle	1,0	0,00	
Positivkontrolle	8,95	6,82	
0,2% (v/v) Ethanol	5,22	2,92	0,135
1% (v/v) Ethanol	7,75	7,49	0,401
10% (v/v) Ethanol	*	*	

Tab. 7: Relative IL-8-mRNA-Expression in humanen Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen.

Angegeben sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), sowie die dazugehörigen p-Werte aus insgesamt 4 unabhängigen Versuchen im Doppelansatz. Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittelexposition, jedoch TNF- α -Stimulation).

DMSO führte konzentrationsabhängig zu einer Suppression (0,2% v/v DMSO, $p < 0,05$) bzw. einer nicht-signifikanten Induktion (1% v/v DMSO) der IL-8-mRNA-Expression TNF- α -stimulierter humaner Keratinozyten. Für eine DMSO-Konzentration von 10% ließen sich aufgrund der Zelltoxizität mit nicht nachweisbarer GAPDH-Expression keine Induktionswerte bestimmen (*).

Behandlung der Zellen	MW	SD	p-Wert
Negativkontrolle	1,0	0,00	
Positivkontrolle	17,30	6,79	
0,2% (v/v) DMSO	11,74	2,42	0,025
1% (v/v) DMSO	25,61	15,43	0,094
10% (v/v) DMSO	*	*	

Tab. 8: Relative IL-8-mRNA-Expression in humanen Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen

Angegeben sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), sowie die dazugehörigen p-Werte aus insgesamt 4 unabhängigen Versuchen im Doppelansatz. Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittelexposition, jedoch TNF- α -Stimulation).

Bei 0,2%-igem DMI kam es zu einer 1,7-fachen Induktion der TNF- α -induzierten IL-8-mRNA-Expression ($p < 0,05$). Für DMI-Konzentrationen höher als 1% war aufgrund der Zytotoxizität keine GAPDH-Expression nachweisbar, so dass sich keine Induktionswerte bestimmen ließen (*).

Behandlung der Zellen	MW	SD	p-Wert
Negativkontrolle	1,0	0,00	
Positivkontrolle	10,98	8,35	
0,2% (v/v) DMI	18,34	13,45	0,041
1% (v/v) DMI	*	*	
10% (v/v) DMI	*	*	

Tab. 9: Relative IL-8-mRNA-Expression bei humanen Keratinozyten nach Behandlung mit unterschiedlichen DMI-Konzentrationen.

Angegeben sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD), sowie die dazugehörigen p-Werte aus insgesamt 5 unabhängigen Versuchen im Doppelansatz. Die statistische Analyse bezieht sich grundsätzlich auf die Positivkontrolle (keine Lösungsmittelexposition, jedoch TNF- α -Stimulation).

Zur besseren Vergleichbarkeit des Einflusses der unterschiedlichen Lösungsmittel auf die TNF- α -induzierte IL-8-mRNA-Expression in humanen Keratinozyten wurden die vorausgehenden Ergebnisse zusammengefasst und graphisch in der nachstehenden Abbildung 5 dargestellt.

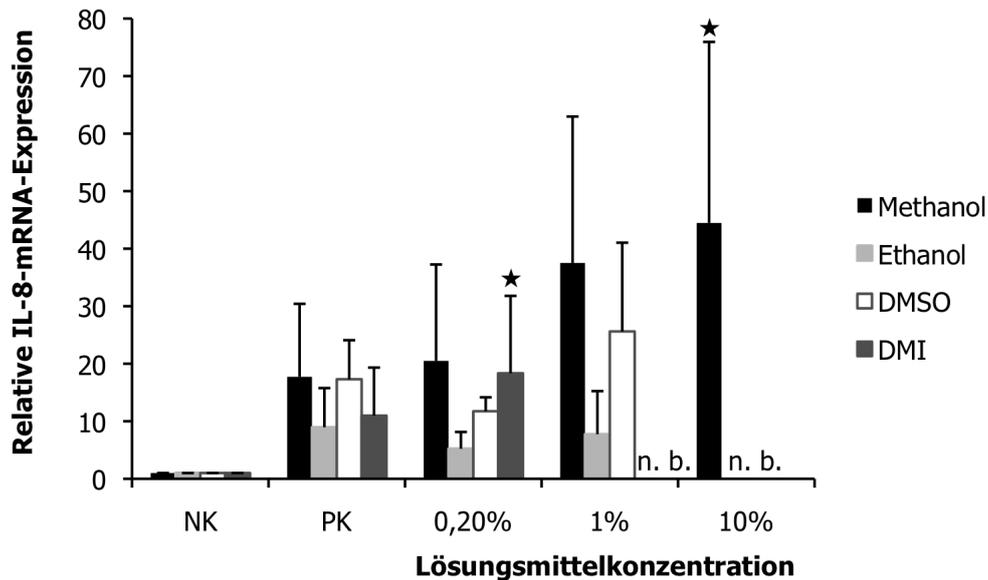


Abb. 5: Zusammenfassende Darstellung der in Tabelle 6 - 9 angegebenen Ergebnisse zur vergleichenden Beurteilung des Einflusses verschiedener Lösungsmittel auf die TNF- α induzierte IL-8-mRNA-Expression humaner Keratinozyten

Angegeben sind die relativen IL-8-mRNA-Expressionswerte in Abhängigkeit der einzelnen Lösungsmittel sowie jeweilige Negativkontrolle (NK) und Positivkontrolle (PK) und deren Standardabweichung. Die statistische Analyse bezog sich grundsätzlich auf die jeweilige Positivkontrolle (keine Lösungsmittelsexposition, jedoch TNF- α -Stimulation), \star : $p < 0,05$. Ab einer DMI-Konzentration von 1 % sowie für Ethanol und DMSO in einer Konzentration von 10% war eine Auswertung der IL-8-mRNA-Expression aufgrund der Zytotoxizität der Lösungsmittel nicht möglich bzw. sinnvoll (n. b.: nicht berechnet).

4 Diskussion

Das Krankheitsbild der Psoriasis war bereits in der Bibel bekannt (2. Könige 5, 1 - 27) und wurde lange Zeit fälschlicherweise als infektiöse Hauterkrankung verkannt (altgriechisch Psora = Jucken, Krätze), Verwechslungen mit Lepra waren häufig. In England erfolgte Anfang des 19. Jahrhunderts erstmals die Definition der Psoriasis im heutigen Sinne durch Robert Willan (1809).

Die Psoriasis vulgaris, häufigste klinische Form dieser Hautkrankheit, kommt in unterschiedlichen Schweregraden vor. Dies hat nicht nur Konsequenzen für die Lebensqualität der betroffenen Menschen, sondern auch Auswirkungen auf die zu wählende Therapiestrategie. Bei mittelschweren bis schweren Verläufen der Psoriasis wird in der Regel eine systemische Behandlung empfohlen (Nast et al., 2007). In Deutschland ist das am häufigsten für die systemische Psoriasis-Therapie verwendete Medikament das seit 1994 zugelassene Fumaderm[®] mit dem Hauptbestandteil Dimethylfumarat.

Über den antipsoriatischen Effekt von Fumarsäureestern wurde erstmals 1959 von Schweckendiek, einem deutschen Chemiker, berichtet, der in Selbstversuchen durch Einnahme von Fumarsäureestern eine Besserung seiner Psoriasis erzielen konnte (Schweckendiek, 1959).

Die therapeutische Wirksamkeit von Fumarsäureestern konnte in klinischen Studien bei Psoriasis gezeigt werden (Altmeyer et al., 1994; Mrowietz et al., 1998). Jüngst haben die Daten zur Wirkung von DMF bei der oralen Therapie der multiplen Sklerose gezeigt, dass der immunmodulierende Effekt von DMF auch bei anderen immun-vermittelten entzündlichen Erkrankungen genutzt werden kann (Kappos et al, 2008; Linker et al., 2008).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass *in vitro* relativ hohe Fumaratkonzentrationen notwendig sind, um Effekte auf Zellen zeigen zu können (Mrowietz und Asadullah, 2005). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Substanzen DMF und Monomethylfumarat (MMF) in Wasser nicht löslich sind und somit alternative Lösungsmittel verwendet werden müssen, die ihrerseits spezifische Effekte auf die zu untersuchenden Zellen haben könnten. Bislang wurden insbesondere Methanol und DMSO zur Lösung von Fumarsäureestern verwendet.

Systematische Untersuchungen über spezifische, konzentrationsabhängige Effekte unterschiedlicher Lösungsmittel sind bisher nicht erfolgt.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Lösungsmittel Methanol, Ethanol, DMSO und DMI auf humane Keratinozyten zu untersuchen und somit ihre Eignung für zukünftige Versuche mit Fumaraten zu prüfen. Dazu wurden Zytotoxizitäts- und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

Für die dargestellten Untersuchungen wurden humane Keratinozyten unterschiedlichen Konzentrationen der oben genannten Lösungsmittel ausgesetzt. Als Vergleich wurden lösungsmittelfrei in Kultur gehaltene Zellen untersucht.

Es wurde der Einfluss von Lösungsmittelkonzentrationen von bis zu 10% untersucht. Eine Konzentration von 10% kommt in Versuchen mit Fumaraten nicht zur Anwendung, sollte jedoch in dieser Arbeit den maximal-toxischen Effekt der Substanzen verdeutlichen. Üblicherweise wurden in bisherigen Versuchen, wenn hohe DMF-Konzentrationen eingesetzt wurden, Lösungsmittelkonzentrationen von maximal 1% verwendet.

Mittels Neutralrottest ließ sich zeigen, dass Methanol in Konzentrationen bis 10% einen vergleichsweise geringen zytotoxischen Effekt auf Keratinozyten besitzt. Als einziges der vier Lösungsmittel wurde auch bei einer Konzentration von 10% die EC_{50} nicht erreicht. Ein statistisch signifikanter Einfluss zeigte sich ausschließlich bei einer Methanolkonzentration von 10%. Im Vergleich zeigte DMI einen ausgeprägten toxischen Effekt auf die verwendeten Keratinozyten, die ermittelte EC_{50} war bereits bei einer Lösungsmittelkonzentration von 1,4% erreicht. Alle DMI-Konzentrationen oberhalb von 0,2% zeigten signifikante Abweichungen zur Kontrolle.

Der zytotoxische Effekt von DMSO auf humane Keratinozyten ist bis zu einer Konzentration von 1% gering ausgeprägt, nimmt jedoch ab höheren Konzentrationen in einem solchen Ausmaß zu, dass bei einer Konzentration von 10% die Zellvitalität auf 10,6% abgesunken ist. Die EC_{50} ist bei einer Konzentration von 5,8% erreicht. Bei DMSO-Konzentrationen von 0,2%, 2% und 10% wurde ein p-Wert von $<0,01$ erreicht.

Für Ethanol zeigen sich in allen untersuchten Konzentrationen $>0,2\%$ statistisch signifikante Einflüsse auf die Keratinozytenvitalität. Dabei lässt sich mit steigender

Konzentration eine rasch sinkende Zellvitalität darstellen, die EC_{50} ist bereits bei einer Konzentration von 2,8% erreicht. Jedoch sinkt die Keratinozyten-Vitalität für 10%-iges Ethanol weniger stark als bei DMSO der gleichen Konzentration und liegt bei 20,1%.

Diese Ergebnisse konnten anhand der ergänzenden molekularbiologischen Analyse bestätigt werden. Als Maßstab für die Zellintegrität wurde nach RNA-Isolierung der mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Lösungsmitteln behandelten sowie mit $TNF-\alpha$ stimulierten Keratinozyten die GAPDH-Expression mittels Realtime-RT-PCR analysiert. Einzig Methanol zeigte auch in einer Konzentration von 10% eine adäquat messbare GAPDH-mRNA-Expression. Bei Verwendung von DMI ließen die ermittelten GAPDH-Werte erkennen, dass die Zellen bereits bei einer Konzentration von 1% massiv geschädigt waren.

Die funktionellen Untersuchungen zeigten, dass Methanol in allen untersuchten Konzentrationen die IL-8-mRNA-Expression induziert, ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle fand sich nur bei einer Konzentration von 10%. Bei der Verwendung von DMSO hingegen kam es konzentrationsabhängig entweder zu einer signifikanten Suppression (um das 0,7-fache im Vergleich zur Positivkontrolle bei der Verwendung von einer 0,2 %-igen DMSO-Lösung) oder zu einer Induktion (bei 1% v/v DMSO um das 1,6-fache).

Ethanol führte in den Konzentrationen 0,2% und 1% jeweils zu einer Hemmung der Expression um das 0,6-, bzw. 0,9-fache im Vergleich zur Positivkontrolle, eine signifikante Abweichung zur Kontrolle wurde nicht ermittelt. Bei einer Konzentration von 10% war es sowohl bei Ethanol als auch bei DMSO aufgrund des verursachten Zellschadens nicht möglich, Aussagen über die IL-8-mRNA-Expression zu machen.

Bei DMI war es einzig möglich die relative IL-8-mRNA-Expression für eine Konzentration von 0,2% zu quantifizieren, es kam zu einer signifikanten 1,7-fachen Induktion. Höhere DMI-Konzentrationen führten zur Verminderung der Zellvitalität und damit gestörter GAPDH-Expression, so dass eine Auswertung der Ergebnisse nicht möglich bzw. sinnvoll war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wahl des richtigen Lösungsmittels für die Aussagekraft von *in vitro*-Experimenten mit Fumarsäureestern, insbesondere

DMF, von großer Bedeutung ist. Anzustreben ist dabei neben fehlender oder minimaler Zytotoxizität des Lösungsmittels ein möglichst geringer Einfluss des Lösungsmittels auf die Expression von Zytokinen oder anderen zu untersuchenden Molekülen im jeweils verwendeten Zellkultursystem.

In den bisher vorliegenden Untersuchungen zur Wirkung von Fumarsäureestern in verschiedenen *in vitro*-Systemen wurde meist Methanol, jedoch auch DMSO als Lösungsmittel verwendet (Höxtermann et al., 1998; Treumer et al., 2003); Vandermeeren et al., 1997). Unter den in dieser Arbeit getesteten Lösungsmitteln konnte nur Methanol als optimal angesehen werden.

Die Verknüpfung eines Testsystems zum Nachweis von Zytotoxizität mit dem Nachweis der Zellfunktion (TNF- α -stimulierte Produktion und Freisetzung von IL-8) unter dem Einfluss der verschiedenen Lösungsmittel erlaubten auch für weiterführende experimentelle Analysen relevante Aussagen.

Wie die Versuche dieser Arbeit zeigen, können die Lösungsmittel DMI und Ethanol bereits in geringen Konzentrationen auf die untersuchten Keratinozyten toxisch wirken und zum Zelltod führen. Daher ist bei der Beurteilung in der wissenschaftlichen Literatur erhobener Befunde die Frage nach dem verwendeten Lösungsmittel von großer Bedeutung.

Schon Höxtermann et al. (1998) konnten eine Verminderung von T-Lymphozyten durch eine Therapie mit Fumarsäureestern nachweisen. In weiteren Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass diese Verminderung mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) vor allen in aktivierten T-Lymphozyten vermittelt wird (Treumer et al., 2003). Auch bei dendritischen Zellen, die aus Monozyten differenziert wurden, induzierte DMF und in hohen Dosen auch Monomethylfumarat (MMF) Apoptose (Zhu und Mrowietz, 2001). Diese Daten belegen die Wirkung von DMF als Induktor von Apoptose in verschiedenen Zellsystemen.

Die im Vorhergehenden beschriebenen Arbeiten zur Wirkung von DMF auf T-Lymphozyten und dendritische Zellen wurden unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel durchgeführt. Dies hat nach den in dieser Arbeit erhobenen Befunden den geringsten Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

Jedoch können entsprechende Versuche auch unter Verwendung von DMSO durchgeführt werden. So haben beispielsweise Vandermeeren et al. (1997) die Modulation von Adhäsionsmolekülen bei Zytokin-stimulierten humanen Endothelzellen durch DMF, das in DMSO gelöst war, zeigen können, während die DMSO-Kontrolle keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter hatte. Dabei wurde von den Autoren eine DMSO-Konzentration von 0,033% verwendet, welche nach den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit nur einen minimalen Effekt auf die Zellvitalität von Keratinozyten hat.

Wichtig erscheint auch, dass die zur Lösung von DMF verwendeten Substanzen nicht nur die Vitalität der Zellen beeinflussen, sondern auch deren Funktionen. Daher wurde in dieser Arbeit neben dem Neutralrottest auch die funktionelle Aktivität durch Messung der TNF- α induzierten IL-8-mRNA-Expression gemessen.

Es zeigte sich, dass eine DMSO-Exposition konzentrationsabhängig entweder zu einer Induktion oder einer Suppression führen kann. Eine Exposition mit DMSO in einer Konzentration von 0,2% hatte eine signifikante Suppression der IL-8-mRNA-Expression um den Faktor 0,7 zur Folge. Hingegen führte 1%-iges DMSO zu einer nicht-signifikanten 1,6-fachen Induktion.

Im Vergleich kam es bei den Lösungsmitteln Ethanol, Methanol und DMI bei den untersuchten Konzentrationen ausschließlich zu einer Suppression (Ethanol) bzw. einer Induktion (Methanol und DMI). Ethanol führte in Konzentrationen von 0,2% zu einer Expressionsreduktion um etwa die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle, die zwar mit TNF- α stimuliert wurde, jedoch keinem Lösungsmittel ausgesetzt war; bei einer Ethanolkonzentration von 1% wurde die Expression nur auf das 0,8-fache reduziert. Methanol führte konzentrationsabhängig zu einer Induktion, die sich jedoch nur in einer Konzentration von 10% signifikant von der Positivkontrolle unterschied.

DMI induzierte in einer Konzentration von 0,2% die IL-8-mRNA-Expression signifikant um den Faktor 1,7. Weitere Induktionswerte ließen sich - wie bereits dargestellt - aufgrund mangelnder GAPDH-Expression nicht bestimmen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Methanol aufgrund des geringsten Einflusses auf die TNF- α -stimulierte IL-8-mRNA-Expression von den hier untersuchten Substanzen das ideale Lösungsmittel für DMF darstellt.

Es bleibt zu klären, ob der dargestellte Einfluss der untersuchten Lösungsmittel auf die IL-8-mRNA-Expression unabhängig von einer TNF- α -Stimulation hervorzurufen ist und somit allein auf eine Reaktion der Zellen auf die Lösungsmittlexposition zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Methanol in Konzentrationen bis 1% als potentiell geeignetes Lösungsmittel für DMF am besten geeignet ist, da in diesen Konzentrationen sowohl der zytotoxische Effekt als auch der Einfluss auf die funktionelle Aktivität der zu untersuchenden Keratinozyten am geringsten ausgeprägt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können dazu beitragen, bei zukünftigen Experimenten mit Fumarsäureestern ein optimal geeignetes Lösungsmittel zu verwenden.

5 Zusammenfassung

Die Psoriasis ist eine weit verbreitete, chronisch verlaufende Hauterkrankung, deren Ätiologie nach wie vor nicht vollständig geklärt ist. Aufgrund bisheriger Untersuchungen wird von einer Störung auf immunologischer Ebene ausgegangen, bei der der Antigen-vermittelten T-Zell-Aktivierung eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird.

Seit der Entdeckung der antipsoriatischen Wirkung von Fumarsäureestern 1959 nehmen diese einen hohen Stellenwert in der systemischen Therapie der Psoriasis ein. Dimethylfumarat (DMF) wird als Hauptwirkstoff eines in Deutschland seit 1994 zugelassenen Präparates (Fumaderm[®]) angesehen. Klinische Studien belegen die Effektivität dieser Substanzen, Fragen zum exakten Wirkmechanismus bleiben jedoch weiterhin offen. Bei den meisten wissenschaftlichen Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Fumarsäureestern handelt es sich um *in vitro*-Versuche, daher müssen die zu untersuchenden Substanzen in geeigneten Lösungsmitteln gelöst werden. Da DMF in Wasser nicht löslich ist, müssen für *in vitro*-Untersuchungen alternative Lösungsmittel verwendet werden, die ihrerseits jedoch spezifische Effekte auf die zu untersuchenden Zellen haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der Lösungsmittel Methanol, Ethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylisobutyl (DMI) für zukünftige *in vitro*-Versuche mit Fumarsäureestern untersucht werden. Hierfür wurde die Zytotoxizität der verschiedenen Substanzen in Abhängigkeit ihrer Konzentration auf humane Keratinozyten mittels Neutralrottest verglichen. Untersuchungen zur Tumornekrosefaktor (TNF)- α -induzierten Interleukin (IL)-8-mRNA-Expression der Zellen mittels Realtime-RT-PCR sollten den Einfluss der zu untersuchenden Substanzen auf die Fähigkeit der Keratinozyten zur Produktion von Zytokinen ergänzend analysieren.

Hinsichtlich der Zytotoxizität zeigten Methanol und DMSO den geringsten Einfluss auf die untersuchten Keratinozyten. Nur minimale zytotoxische Effekte wurden für Methanol beobachtet, die mittlere effektive toxische Konzentration (EC₅₀) wurde auch bei einer Konzentration von 10% Methanol nicht erreicht. Für die übrigen

Lösungsmittel lag die EC_{50} bei deutlich geringeren Konzentrationen: 5,8% für DMSO, 2,8% für Ethanol und 1,4% für DMI.

Die relative IL-8-mRNA-Expression nach Stimulation mit $TNF-\alpha$ wurde von allen getesteten Lösungsmitteln beeinflusst. Hier zeigten sich die geringsten Effekte für die Lösungsmittel Methanol und Ethanol. Nur für Methanol liessen sich Expressionswerte in allen untersuchten Konzentrationen ermitteln, während bei den anderen Lösungsmitteln aufgrund der Zytotoxizität vor allem in höheren Konzentrationen eine Analyse zum Teil nicht möglich war. Dies galt für Ethanol und DMSO in einer Konzentration von 10% sowie bei DMI-Konzentrationen von $\geq 1\%$.

Eine signifikante Induktion der IL-8-mRNA-Expression wurde bei einer Methanolkonzentration von 10% sowie bei einer DMI-Konzentration von 0,2% beobachtet. DMSO führte in Konzentrationen von 0,2% hingegen zu einer signifikanten IL-8-mRNA-Suppression.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen den Schluss zu, dass die Auswahl des richtigen Lösungsmittels und dessen verwendete Konzentration für die Planung von *in vitro*-Versuchen mit Fumarsäureestern sowie für die Interpretation der Ergebnisse eine essentielle Rolle spielt. Von den hier untersuchten Lösungsmitteln kann nur Methanol als optimal angesehen werden und in Konzentrationen $\leq 1\%$ Volumenanteil für funktionelle Untersuchungen an humanen Keratinozyten empfohlen werden.

6 Literaturverzeichnis

Altmeyer PJ, Matthes U, Pawlak F, Hoffmann K, Frosch PJ, Ruppert P, Wassilew SW, Horn T, Kreysel HW, Lutz G, et al. (1994): Antipsoriatic effect of fumaric acid derivatives. Results of a multicenter double-blind study in 100 patients. *J Am Acad Dermatol* 30:977-81.

Altmeyer P, Hartwig R, Matthes U (1996): Efficacy and safety profile of fumaric acid esters in oral long-term therapy with severe treatment refractory psoriasis vulgaris. A study of 83 patients. *Hautarzt* 47:190-6.

Borenfreund E, Puerner JA (1985): Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24:119-24.

Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP (2007): *Dermatology*, 2. revidierte Auflage, 115-135. Mosby Elsevier-Verlag, Philadelphia.

de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, van de Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, Nibbering PH (1996): Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur J Immunol* 26:2067-74.

Dubertret L, Mrowietz U, Ranki A, van de Kerkhof PC, Chimenti S, Lotti T, Schafer G (2006): European patient perspectives on the impact of psoriasis: the EUROPSO patient membership survey. *Br J Dermatol* 155:729-36.

Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N, Christophers E, Voorhees JJ (2001): The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 137:1447-54.

Henseler T (1998): Genetics of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 290:463-76.

Hoefnagel JJ, Thio HB, Willemze R, Bouwes Bavinck JN (2003): Long-term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 149:363-9.

Höxtermann S, Nüchel C, Altmeyer P (1998): Fumaric acid esters suppress peripheral CD4- and CD8-positive lymphocytes in psoriasis. *Dermatology* 196:223-30.

Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, Polman CH, Schmierer K, Yousry TA, Yang M, Eraksoy M, Meluzinova E, Rektor I, Dawson KT, Sandrock AW, O'Neill GN (2008): BG-12 Phase IIb Study Investigators. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet* 372:1463-72

Kemény L, Ruzicka T, Dobozy A, Michel G (1994): Role of interleukin-8 receptor in skin. *Int Arch Allergy Immunol* 104(4):317-22

Linker RA, Lee DH, Stangel M, Gold R (2008): Fumarates for the treatment of multiple sclerosis: potential mechanisms of action and clinical studies. *Expert Rev Neurother* 8:1683-90.

Loewe R, Pillinger M, de Martin R, Mrowietz U, Gröger M, Holnthoner W, Wolff K, Wiegrebe W, Jirovsky D, Petzelbauer P (2001): Dimethylfumarate inhibits tumor-necrosis-factor-induced CD62E expression in an NF-kappa B-dependent manner. *J Invest Dermatol* 117:1363-8.

Loewe R, Holnthoner W, Gröger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D, Hofer E, Wolff K, Petzelbauer P (2002): Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 168:4781-7.

Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG (2007): Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-873.

Mrowietz U, Asadullah K (2005): Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity. *Trends Mol Med* 11:43-8.

Mrowietz U, Christophers E, Altmeyer P (1998): Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study. German Multicentre Study. *Br J Dermatol* 138:456-60.

Mrowietz U, Reich K (2009): Psoriasis - neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie. *Dtsch Ärztebl Int* 106:11-19.

Nast A, Kopp I, Augustin M, Banditt KB, Boehncke WH, Follmann M, Friedrich M, Huber M, Kahl C, Klaus J, Koza J, Kreiselmaier I, Mohr J, Mrowietz U, Ockenfels HM, Orzechowski HD, Prinz J, Reich K, Rosenbach T, Rosumeck S, Schlaeger M, Schmid-Ott G, Sebastian M, Streit V, Weberschock T, Rzany B (2007): German evidence-based guidelines for the treatment of Psoriasis vulgaris (short version). *Arch Dermatol Res* 299:111-138.

Ribaldo R, Gilman M, Kingston RE, Chomczynski P, Sacchi N (2001): Preparation of RNA from tissues and cells. *Curr Protoc Immunol* Chapter 10:Unit 10 11.

Rostami-Yazdi M, Clement B, Schmidt TJ, Schinor D, Mrowietz U (2009): Detection of metabolites of fumaric acid esters in human urine: implications for their mode of action. *J Invest Dermatol* 129:231-4

Sachs L (1979): Statistische Methoden. Springer Verlag, Berlin

Schmid-Ott G, Malewski P, Kreiselmaier I, Mrowietz U (2005): Psychosocial consequences of psoriasis--an empirical study of disease burden in 3753 affected people. *Hautarzt* 56:466-72.

Schulz BS, Michel G, Wagner S, Süß R, Beetz A, Peter RU, Kemény L, Ruzicka T (1993): Increased expression of epidermal IL-8 receptor in psoriasis. Down regulation by FK-506 in vitro. *J Immunol* 151:4399-406

Schweckendiek W (1959): Treatment of psoriasis vulgaris. *Med Monatsschr* 13:103-4.

Treumer F, Zhu K, Glaser R, Mrowietz U (2003): Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *J Invest Dermatol* 121:1383-8.

Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I (1992): Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J Invest Dermatol* 99(3):294-8

Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, Geysen J (1997): Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 234:19-23.

Vandermeeren M, Janssens S, Wouters H, Borghmans I, Borgers M, Beyaert R, Geysen J (2001): Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B1, but not RelA in normal human dermal fibroblast cells. *J Invest Dermatol* 116:124-30.

Willan R (1809): Description and Treatment of Cutaneous Diseases, Volume 1, 152-188. J.-Johnson-Verlag, London.

Zhu K, Mrowietz U (2001): Inhibition of dendritic cell differentiation by fumaric acid esters. *J Invest Dermatol* 116:203-8.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Priv.-Doz. Dr. med. Regine Gläser, für die Vergabe des Themas und auch für die Geduld und Unterstützung bei allen Fragen und Problemen.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, der mir als Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ermöglichte, an seiner Klinik meine Doktorarbeit durchzuführen.

Weiterhin vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Michael Weichenthal für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Ganz herzlich danken möchte ich auch meinen ärztlichen Kollegen, besonders Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz, sowie den Studenten und technischen Assistenten der Arbeitsgruppe „Kutane Entzündungsreaktionen“ für die konstruktive und angenehme Arbeitsatmosphäre.

8 Lebenslauf

Vor- und Nachname	Inga Friederike Strelow
Geburtsdatum	02.06.1982
Geburtsort	Rotenburg/Wümme
Eltern	Doris Strelow, geb. Steigüber, 1951 - 2001 Eginhard Strelow

Schulbildung

1988 - 1992	Grundschule Lindhorst
1992 - 1994	Orientierungsstufe Lindhorst
1994 - 1998	Ratsgymnasium Stadthagen
1998 - 1999	Montgomery County High School, Mt. Sterling, Kentucky, USA
1999 - 2001	Ratsgymnasium Stadthagen
2001	Abitur

Freiwilliges Soziales

Jahr

2001	Deutsche evangelische Gemeinde Caracas, Venezuela Abbruch aufgrund schwerer Erkrankung im engen Familienkreis
------	--

Medizinstudium

2002 - 2008	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Ab 04/2009	Allgemeines Krankenhaus Celle, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Assistenzärztin
------------	---

Veröffentlichungen

09/2009

Teile dieser Arbeit wurden bei der 39. Jahrestagung der "European Society of Dermatological Research" in Budapest präsentiert:

Strelow F, Mrowietz U, Gläser R (2009): Influence of different solvents on the vitality and capacity of cytokine production in human keratinocytes. J Invest Dermatol 129: S23