

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

EINFLUSS VON ADIPOKINEN AUF DIE EXPRESSION VON ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN IN HUMANEN KERATINOZYTEN

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

vorgelegt von

JASMIN SIEWERT
aus Minden (Westfalen)

Kiel 2012

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gläser
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Laudes
Tag der mündlichen Prüfung:	15. April 2013
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	15. April 2013

gez.: Prof. Dr. Roider
(Ausschussvorsitzender)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Hintergrund	7
1.2 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Einwegmaterialien	14
2.1.4 Zellkultur	14
2.1.5 Oligonukleotide, Kits und Antikörper	15
2.1.6 Puffer und Lösungen für ELISA	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Keratinozyten	17
2.2.2 Subkultivierung der Keratinozyten	17
2.2.3 Stimulationsexperimente	18
2.2.4 RNA-Isolierung	18
2.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration	19
2.2.6 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	19
2.2.7 Real-time quantitative PCR (RTq-PCR)	20
2.2.8 Quantifizierungsmethode	22
2.2.9 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)	23
2.2.10 Statistische Analyse	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Experimenteller Aufbau und Datengewinnung	27
3.2 Zeitkinetik: Ergebnisdarstellung und Analyse	28
3.3 Dosiskinetik: Ergebnisdarstellung und Analyse	33
3.4 Expressionsunterschiede zwischen den Keratinozyten-Chargen	36
4. Diskussion	38
4.1 Konzentration der verwendeten Adipokine	38

Inhaltsverzeichnis

4.2	AMP-Synthese humaner Keratinozyten nach Inkubation mit Adipokinen _____	39
4.2.1	Stimulation mit Adiponektin _____	39
4.2.2	Stimulation mit Leptin _____	45
4.2.3	Stimulation mit Resistin und Visfatin _____	48
4.2.4	Hohe Variabilität der Expressionshöhe zwischen den verwendeten Zellchargen ____	48
4.2.5	Abschließende Beurteilung _____	49
5.	Zusammenfassung _____	50
	Literaturverzeichnis _____	52
	Danksagung _____	59
	Lebenslauf _____	60

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AdipoR	Adiponektin-Rezeptor
AG	Arbeitsgruppe
AMP	antimikrobielles Peptid/Protein
Aqua ad in.	<i>Aqua ad iniectabilia</i> , Wasser zu Injektionszwecken
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , elementarer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAU	Christian-Albrechts-Universität
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
C _T	<i>threshold cycle</i> , Zyklus-Schwellenwert
d.h.	das heißt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxygenierte Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
d(T)	desoxygenierten Thymin-Basen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immuno-adsorptionstest
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes</i> , immortalisierte,

Abkürzungsverzeichnis

	nicht-tumorigene humane Zelllinie
hBD	humanes β -Defensin
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i> , Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HCl	Salzsäure
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN	Interferon
IGF	<i>insuline-like growth factor</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i> , Keratinozyten-Wachstumsfaktor
KGM2	<i>keratinocyte growth medium 2</i> , Medium zur Zellkultur von Keratinozyten
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Lsg.	Lösung
M	Molar (mol/l)
Min.	Minute(n)
mM	Milli-Molar (mmol/l)
μ M	Mikro-Molar (μ mol/l)
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat wasserfrei
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
nm	Nanometer
o.g.	oben genannte(n)
PAK	Primärantikörper

Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , aus Thrombozyten freigesetzter Wachstumsfaktor
POD	Peroxidase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SAK	Sekundärantikörper
Sek.	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAK	<i>transforming-growth factor β-activated kinase</i> , durch TGF- β aktivierte Kinase
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNS	<i>trypsin neutralizing solution</i> , Trypsin-neutralisierende Lösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
VIS	<i>visible</i> , sichtbares Licht
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Psoriasis (syn. Schuppenflechte) ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, die in westlichen Industrienationen mit einer Prävalenz von 2-3 % auftritt. In Deutschland sind daher etwa 2 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen (Mrowietz und Reich 2009). Angesichts der Häufigkeit und der Höhe der Therapiekosten ist die Psoriasis von erheblicher volkswirtschaftlicher Bedeutung, zudem führt die Erkrankung aufgrund der ausgeprägten Hautveränderungen zu einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität und einer starken psychischen Beeinträchtigung der Patienten (Rapp et al. 1999, Dubertret et al. 2006).

Die Psoriasis stellt eine chronisch-rezidivierende entzündliche Hauterkrankung dar, bei der es zu epidermaler Hyperproliferation und Veränderung der Zelldifferenzierung kommt. Dabei stellt der scharf demarkierte erythrosquamöse Plaque die Leiteffloreszenz dieser Erkrankung dar. Typische Prädilektionsstellen sind der behaarte Kopf, die Streckseiten der Extremitäten sowie die Sakralregion. Neben den Hautveränderungen kann es auch zu Nagelveränderungen kommen (Wolff et al. 2007).

Die häufigste Form der Erkrankung ist die *Psoriasis vulgaris*. Sie verläuft chronisch-stationär und ist durch großflächige Plaques gekennzeichnet. Hiervon wird die *Psoriasis guttata* unterschieden, die sich durch kleinere punktförmige Plaques am gesamten Integument auszeichnet. Diese Form tritt oft postinfektiös auf und stellt häufig die Erstmanifestation einer Psoriasis dar. Sonderformen wie *Psoriasis inversa* bzw. intertriginöse Psoriasis (Befall von sonst ausgesparten Regionen wie Genitalregion bzw. intertriginöse Areale) und *Psoriasis pustulosa* (Entwicklung von sterilen Pusteln am gesamten Integument) werden unterschieden, selten kommt es zur *psoriatischen Erythrodermie*. In etwa 20 % der Fälle entwickelt sich eine als *Psoriasisarthritis* bezeichnete entzündliche Erkrankung der Gelenke, oft nach lange bestehender kutaner Manifestation, selten jedoch auch vor oder ohne Beteiligung der Haut (Wolff et al. 2007).

Darüberhinaus werden zwei Krankheitstypen unterschieden. Die Typ 1- oder „early onset“ Psoriasis mit einem Inzidenzgipfel in der 2. und 3. Lebensdekade tritt in 70 % der Fälle auf und ist durch einen schwereren Verlauf und schlechteres Therapieansprechen gekennzeichnet, die Schuppenflechte kommt hier familiär gehäuft vor und ist in 40 % der Fälle mit bestimmten Merkmalen von humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Molekülen verknüpft (HLA-Cw6 und -DR7). Bei der Typ 2- oder „late onset“ Psoriasis, die einen Inzidenzgipfel in der 5. und 6. Lebensdekade aufweist, gibt es dagegen häufig weder eine positive Familienanamnese noch eine Assoziation mit HLA-Eigenschaften, insgesamt verläuft die Erkrankung vielfach milder (Henseler und Christophers 1985).

Die genetischen Grundlagen der Psoriasis sind Gegenstand aktueller Forschung, es wird jedoch als gesichert angesehen, dass der Schuppenflechte ein multigenetischer Vererbungsmechanismus zugrunde liegt. Die wenigen Gene, für die bislang eine Assoziation mit der Erkrankung belegt ist, scheinen dabei größtenteils für Proteine mit immunologischen Funktionen zu kodieren (Bowcock und Krueger 2005, Liu et al. 2007, Strange et al. 2010).

Auch die Pathogenese der Psoriasis ist bislang nur unvollständig verstanden. Grundlegend scheint es sich um einen Zustand chronischer Entzündung zu handeln, in dem die Interaktion von Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems eine zentrale Rolle spielt (Schröder et al. 2006). Dabei scheint die Aktivierung von T-Zellen, vermutlich durch dendritische Zellen vermittelt, eine Schlüsselrolle einzunehmen. Es wird außerdem angenommen, dass eine gegenseitige Beeinflussung zwischen den Immunzellen und den Keratinozyten stattfindet (Lowes 2007).

Patienten mit Psoriasis leiden im Vergleich zu Individuen ohne Schuppenflechte etwa doppelt so häufig an Erkrankungen wie Adipositas, koronarer Herzkrankheit, Hypertonus, Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 sowie dem Vollbild des metabolischen Syndroms (Lindegård 1986, Henseler und Christophers 1995), was mit einer Erhöhung der Morbidität und Mortalität einhergeht (Mrowietz et al. 2006, Gerdes und Mrowietz 2009). Es wird vermutet, dass diese Begleiterkrankungen durch den bei Psoriasis bestehenden chronischen Entzündungszustand verstärkt werden (Christophers 2007). Darüberhinaus haben Psoriasispatienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Komplikationen wie Arteriosklerose von Koronargefäßen, Myokardinfarkt oder zerebralem Insult (Gelfand et al. 2006, Cohen et al. 2008, Augustin et al. 2010).

Antimikrobielle Peptide bei Psoriasis

Eine weiteres Merkmal der Psoriasis ist die vermehrte Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMP) sowohl in läsionaler als auch in nicht befallener Haut der Patienten (Harder et al. 2010). Einige der heute bekannten AMP wurden sogar erstmalig in den Schuppen von Psoriasispatienten entdeckt, da diese trotz der ausgeprägten Barrierestörung der Haut nur selten Hautinfektionen aufweisen (Henseler und Christophers 1995, Harder et al. 1997, Harder et al. 2001).

AMP sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems und werden vor allem von Epithelzellen der Haut und Schleimhaut sowohl konstitutiv als auch induzierbar exprimiert. Die kleinen endogenen Peptide werden auch als Antibiotika der Haut bezeichnet und sind gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen einschließlich multiresistenter Bakterienstämme wirksam, darüberhinaus scheinen sie auch immunmodulatorische Wirkung zu haben (Harder et al. 2007).

Der genaue Wirkmechanismus ist bei den meisten beschriebenen AMP noch unklar. Angenommen wird, dass die kleinen kationischen Peptide elektrostatisch an die negativ geladene

Bakterienmembran binden und zu einer Desintegration der Membran mit anschließender Lyse des Bakteriums führen (Brogden 2005). Ein weiterer Wirkmechanismus von AMP ist der Entzug essentieller Ionen (z.B. Zink bei Psoriasis, Gläser et al. 2005).

Es wird auch vermutet, dass AMP an der Pathogenese einer Reihe chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie Morbus Crohn, cystischer Fibrose und Psoriasis beteiligt sein könnten, da hier ein verändertes Expressionsprofil dieser Peptide gezeigt werden konnte (Harder et al. 2007). Bei Patienten mit Psoriasis wurde mehrheitlich eine deutliche Erhöhung der AMP-Expression und -Freisetzung nachgewiesen, besonders belegt ist dies für Psoriasis (S100A7), RNase 7 und die humanen β -Defensine (hBD)-2 und -3 (de Jongh et al. 2005, Gambichler et al. 2008, Harder et al. 2010).

HBD-2 wurde als erstes der humanen antimikrobiellen Peptide aus psoriatischen Schuppen isoliert (Harder et al. 1997). Es wird außer von Keratinozyten u.a. auch von Zellen des Gastrointestinaltrakts und von Chondrozyten exprimiert (Harder et al. 1997, Varoga et al. 2004), seine Freisetzung kann dabei durch Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-1 β , -17 und -22 induziert werden (Harder et al. 2007). Das Peptid ist vor allem gegen gramnegative Bakterien und Pilze aktiv (Harder et al. 1997, Schröder und Harder 1999) und wirkt darüberhinaus chemotaktisch auf Immunzellen (Yang et al. 1999, Niyonsaba et al. 2002, Niyonsaba et al. 2004).

HBD-3 wird hauptsächlich in Keratinozyten und Atemwegsepithel exprimiert, seine Freisetzung wird durch Kontakt mit Bakterien und durch Stimulation mit TNF- α und IFN- γ angeregt (Harder et al. 2001, Garcia et al. 2001). Seine antimikrobielle Aktivität umfasst ein breites Spektrum an Bakterien inklusive multiresistenter Keime und Pilze, auch eine möglich antivirale Wirkung wird diskutiert (Harder et al. 2001, Garcia et al. 2001, Quinones-Mateu et al. 2003, Hazrati et al. 2006). HBD-3 vermittelt außerdem Chemotaxis von Monozyten und kann Mastzellen rekrutieren und aktivieren (Wu et al. 2003, Chen et al. 2007).

Das S-100 Protein Psoriasis wurde ursprünglich in läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten entdeckt (Madsen et al. 1991). Psoriasis ist das vorherrschende antimikrobielle Peptid der menschlichen Haut, das bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen hohe Aktivität gegen *Escherichia coli* (*E.coli*) zeigt (Gläser et al. 2005). Bekannte Induktoren der Freisetzung von Psoriasis aus Keratinozyten sind neben den Bakterien selbst IL-1 β , TNF- α , UV-Licht sowie eine Barrierestörung der Haut (Gläser et al. 2005, Gläser et al. 2009a, Gläser et al. 2009b).

RNase 7 gehört zu der RNase A-Superfamilie, deren gemeinsame Eigenschaft die Fähigkeit zum Abbau von RNA ist. Die Freisetzung des konstitutiv exprimierten Peptids kann durch Kontakt mit Bakterien, IL-1 β und IFN- γ verstärkt werden, dabei weist RNase 7 bereits in nanomolekularen Konzentrationen ein breites antimikrobielles Spektrum gegen Bakterien einschließlich multiresistenter Stämme und gegen Pilze auf (Harder und Schröder 2002).

Adipokine bei Psoriasis

Ein weiteres Merkmal von Patienten mit Psoriasis ist die veränderte Freisetzung von Adipokinen (Johnston et al. 2008, Kaur et al. 2008, Gerdes et al. 2011). Dabei handelt es sich um eine Gruppe bioaktiver Polypeptide, die hauptsächlich von Fettzellen produziert werden. Zu den Adipokinen werden u.a. Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin gezählt, außerdem Zytokine des Immunsystems wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Desruisseaux et al. 2007, Deng und Scherer 2010). Sie haben vielfältige metabolische und immunologische Funktionen und beeinflussen beispielsweise den Fett- und Glukosestoffwechsel, die Hämostase, aber auch die Entstehung von Arteriosklerose (Deng und Scherer 2010, Ouchi et al. 2011). Das Zusammenspiel einiger Adipokine zeigt Abb. 1: so steigern z.B. Leptin, Resistin und Visfatin nachweislich die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, Adiponektin dagegen supprimiert deren Freisetzung (Rabe et al. 2008, Gerdes et al. 2011).

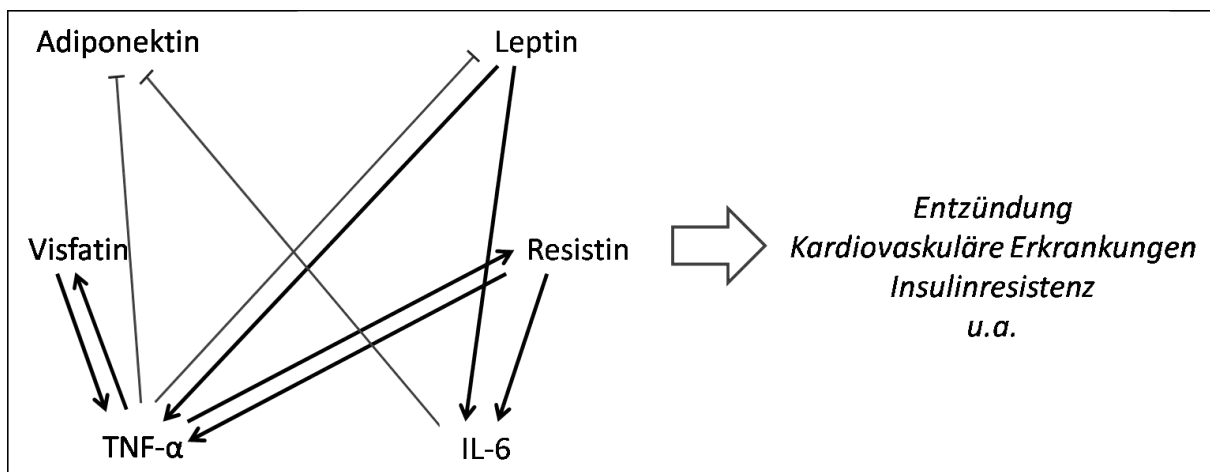


Abb. 1 Wechselwirkungen verschiedener Adipokine.

[Quelle: modifiziert nach: Rabe et al., 2008; Gerdes et al., 2011]

Die Veränderungen im Adipokin-Sekretionsprofil von Patienten mit Psoriasis wurden in ähnlicher Weise auch bei Adipositas gefunden (Considine et al. 1996, Arita et al. 1999, Cnop et al. 2003), es zeigten sich verminderte Serumspiegel von Adiponektin bei gleichzeitig erhöhter Sekretion von Leptin und Resistin (Johnston et al. 2008, Kaur et al. 2008, Takahashi et al. 2008). Auch für Visfatin konnte bei Patienten mit Psoriasis mittels Genexpressionsanalyse eine Hochregulation in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes und in Hautproben nachgewiesen werden (Zhou et al. 2003, Koczan et al. 2005). Dabei wird vermutet, dass das gleichzeitige Auftreten von Adipositas und Psoriasis zu Interaktionen der beiden Erkrankungen führen könnte, wobei Adipokine zumindest teilweise eine Rolle spielen und zu den mit der Schuppenflechte assoziierten Begleiterkrankungen beitragen könnten (Gerdes et al. 2011).

Adiponektin fördert unter anderem die Glukoseaufnahme in Leber- und Muskelzellen, stimuliert die Insulinsekretion und wirkt antiatherogen (Okamoto et al. 2006, Deng und Scherer 2010). Nachweislich haben Patienten mit verminderten Adiponektin-Serumleveln ein erhöhtes Risiko, an Diabetes mellitus Typ 2, Hypertension oder Dyslipoproteinämie zu erkranken (Iwashima et al. 2004, Okamoto et al. 2006). Insgesamt werden Adiponektin entzündungshemmende Funktionen wie die Induktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und des IL-1-Rezeptorantagonisten zugeschrieben (Wolf et al. 2004).

Als Gegenspieler von Adiponektin verstärkt Leptin eine Insulin-Resistenz, die bei Adipositas, aber auch bei Patienten mit Psoriasis vermehrt zu beobachten ist (Rabe et al. 2008). Außerdem ist das Adipokin an der Steuerung der Nahrungsaufnahme und des Hungergefühls durch den Hypothalamus beteiligt (Schwartz et al. 2000). Leptin wirkt größtenteils proinflammatorisch, so wurden neben der Induktion proinflammatorischer Zytokine auch Einflüsse auf T-Lymphozyten und Monozyten beschrieben (Fantuzzi 2005), darüberhinaus scheint es chemotaktisch auf verschiedene Immunzellen zu wirken (Ottonello et al. 2004, Gruen et al. 2007).

Auch Resistin führt im Tiermodell zur Insulin-Resistenz, seine genaue Funktion im Menschen ist jedoch nicht bekannt. Neuere Daten weisen auf eine Rolle in entzündlichen Prozessen hin (Rabe et al. 2008, Deng und Scherer 2010), so wird beispielsweise eine Assoziation des Adipokins mit rheumatoider Arthritis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert (Senolt et al. 2007, Konrad et al. 2007). Auch ein Zusammenhang mit Arteriosklerose und koronarer Herzerkrankung wird beschrieben (Reilly et al. 2005, Filkova et al. 2009), desweiteren korrelieren Resistinkonzentrationen mit inflammatorischen Markern wie dem C-reaktiven Protein (Shetty et al. 2004, Reilly et al. 2005).

Über die Funktionen von Visfatin, das zunächst als „Pre-B cell colony-enhancing factor“ entdeckt und später den Adipokinen zugeordnet wurde, ist bisher ebenfalls wenig bekannt (Samal et al. 1994, Fukuhara et al. 2005). Es scheint eine Rolle in der Energie-Homöostase der Zelle zu spielen und weist vermutlich Insulin-mimetische Eigenschaften auf (Rongvaux et al. 2002, Fukuhara et al. 2005, Luk et al. 2008). Erhöhte Serumspiegel finden sich bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und metabolischem Syndrom (Chang et al. 2010). Bekannte immunologische Funktionen von Visfatin sind u.a. Inhibition der Apoptose von neutrophilen Granulozyten, Induktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten und Förderung der Aktivierung von T-Zellen (Jia et al. 2004, Moschen et al. 2007, Tilg und Moschen 2008).

1.2 Zielsetzung

Die veränderte Freisetzung der Adipokine bei Psoriasis wird bislang vor allem mit der Entwicklung von metabolischen Begleiterkrankungen in Verbindung gebracht (Johnston et al. 2008, Shakery et al. 2009), während die vermehrte Expression und Sekretion verschiedener AMP als Zeichen einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Psoriasis-bedingte proinflammatorische Stimuli gedeutet wird (Mrowietz und Reich 2009). Beide Eigenschaften werden in der aktuellen Literatur jedoch nicht miteinander in Verbindung gebracht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob Adipokine einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von AMP durch Keratinozyten haben. Hintergrund ist die zum jetzigen Zeitpunkt nur unvollständig verstandene Pathogenese der Psoriasis, in die genetische und immunologische Vorgänge involviert scheinen. Ob die AMP an der Genese oder Aufrechterhaltung der Erkrankung beteiligt sind ist unklar, ein stimulierender Einfluss der Peptide auf Immunzellen ist jedoch bekannt. Gleiches gilt für die ebenfalls immunologisch wirksamen Adipokine, deren Rolle bei der Entstehung der Psoriasis und deren Begleiterkrankungen ebenfalls noch nicht geklärt ist.

Um in der vorliegenden Arbeit den direkten Einfluss von Adipokinen auf die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden zu untersuchen, sollten primäre humane epidermale Keratinozyten (NHEK) mit verschiedenen Adipokinen inkubiert und anschließend die Expression von Boten-RNA (mRNA) mehrerer AMP mithilfe von quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion (RTq-PCR) analysiert werden. Die Sekretion der AMP sollte zusätzlich mittels Immunoabsorptionstest (ELISA) analysiert werden.

Zur Stimulation der Keratinozyten wurden Adipokine gewählt, die von vielen Autoren als wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse bezeichnet werden: Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin. Für jedes dieser Adipokine war in der Literatur eine veränderte Freisetzung bei Psoriasis mehrfach belegt (Steppan et al. 2001, Desruisseaux et al. 2007, Kaur et al. 2008, Johnston et al. 2008). Vier repräsentative AMP verschiedener Familien, bei denen eine vermehrte Freisetzung bei Psoriasis nachgewiesen ist (Harder et al. 2010), sollten im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Expression und Sekretion unter dem Einfluss der Adipokine untersucht werden. Dazu wurden mit Psorasin und RNase7 zwei konstitutiv exprimierte AMP ausgewählt, während die humanen β -Defensine 2 und 3 Vertreter der induzierbaren AMP darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Aqua ad iniectabilia</i> (Aqua ad in.)	DeltaSelect, Pfullingen
bovines Serumalbumin (BSA; 1 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	BÜFA, Lübeck
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Ethanol	BÜFA, Lübeck
Isopropanol	BÜFA, Lübeck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumbikarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Roche Diagnostics, Mannheim
Tween® 20 (100 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRizol®-Reagenz	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Trypanblau	Merck, Darmstadt

2.1.2 Geräte

Absauggerät	Flaem Nuova, San Martino della Battaglia (Italien)
Inkubator	Forma Scientific, Marietta (USA)
Laminar-Flow-Bench	Heraeus Instruments, Hanau
Waschgerät für Mikrotiterplatten	BioTek, Bad Friedrichshall
Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan, Crailsheim
PCR-Plattform	7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Branchburg (USA)

pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg Greiner Bio-One, Frickenhausen Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt Sarstedt, Nümbrecht
Plattformschüttler	Heidolph, Kehlheim
Schüttelapparat	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV/VIS-Spektrophotometer (zur Quantifizierung der RNA)	NanoDrop 1000™, Thermo Scientific, Wilmington (USA)
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Einwegmaterialien

24-Loch-Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch-Platte (zur Durchführung der PCR)	Applied Biosystems, Branchburg (USA)
96-Loch-Platte (zur Durchführung der ELISAs)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Okklusionspflaster	Epitest Ltd. Oy, Tuusula (Finnland)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (200 ml, 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Zellkultur

Zellkultur

normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) Promocell, Heidelberg

Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) PromoCell, Heidelberg

serumfrei

supplementiert mit

0,004 ml/ml bovinem Hypophysenextrakt

0,125 ng/ml rekombinantem Human-EGF

5 µg/ml rekombinantem Human-Insulin

0,33 µg/ml Hydrocortison

0,39 µg/ml Adrenalin

10 µg/ml humanem Transferrin

0,15 mM CaCl₂

Spülpuffer (*Phosphate Buffered Saline*; PBS)

PAA Laboratories GmbH, Pasching
(Österreich)

Subkultivierung

Trypsin/EDTA- Lösung (0,025 %/0,01 %)

Promocell, Heidelberg

Trypsin-neutralisierende Lösung (TNS; 0,05 %)

Promocell, Heidelberg

Neubauer-Zählkammer

LO Laboroptik, Friedrichsdorf

Zusätze (rekombinant)

Adiponektin

ProSpec – Tany TechnoGene, Rehovot (Israel)

Endkonzentrationen 50/100/500/1000 ng/ml

Leptin

ProSpec – Tany TechnoGene, Rehovot

Endkonz. 100 ng/ml

Resistin

ProSpec – Tany TechnoGene, Rehovot

Endkonz. 100 ng/ml

Visfatin

Axxora Deutschland, Lörrach

Endkonz. 100 ng/ml

2.1.5 Oligonukleotide, Kits und Antikörper

Oligonukleotide

zur cDNA-Synthese:

Oligo-d(T)_n-Primer

Fermentas, St.Leon-Rot

Sequenz: 5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'

Kits

zur Reversen Transkription:

SuperScript® II RT Set

Invitrogen, Carlsbad

zur PCR:

TaqMan™ Universal PCR Master Mix

Applied Biosystems, Branchburg (USA)

TaqMan™ Gene Expression Assays

Applied Biosystems, Branchburg (USA)

Die zur Amplifikation eines Gens benötigten Materialien wurden in einem vorgefertigten Kit vom Hersteller bezogen. Die für jedes Gen-Produkt einzeln bezogenen Kits enthielten jeweils zwei unmarkierte, genspezifische Primer sowie die mit den FAM- und TAMRA-Farbstoffen markierte

TaqMan™-Sonde, die sequenzspezifisch zwischen den beiden Primern bindet, außerdem einen passiven Referenzfarbstoff (ROX).

Antikörper und Standards für ELISA

Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und Standards gibt Tab. 1. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper gegen RNase 7 wurden von der Arbeitsgruppe Harder der Dermatologie der CAU hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Synthese der Antikörper wurden Versuchstiere mit dem natürlichen Antigen immunisiert und nach Standardmethoden Antikörper generiert (Köten et al. 2009). Auch die Standards mit dem RNase 7-Antigen, das aus humaner Haut gewonnen wurde, wurden freundlicherweise von der AG Harder zur Verfügung gestellt.

<i>Primäre Antikörper</i>		
	RNase 7	hBD-3
Art	polyklonal	polyklonal
Spezies	Ziege	Kaninchen
Endkonzentration	1 µg/ml	0,6 µg/ml
Hersteller	Institut	Acris, Herford
<i>Sekundäre Antikörper [biotinyliert]</i>		
	RNase 7	hBD-3
AK	Ziege	Kaninchen
Art	polyklonal	polyklonal
Endkonzentration	1,3 µg/ml	0,25 µg/ml
Hersteller	Institut	Acris, Herford
<i>Standards</i>		
	RNase 7	hBD-3
Hersteller	Institut	tebu-bio, Offenbach

Tab. 1 *Verwendete Antikörper und Standards für ELISA.*

2.1.6 Puffer und Lösungen für ELISA

Carbonat-

- puffer:
- Stammlsg. A:* 10,6 g Na₂CO₃
ad 500 ml Aqua dest.
 - Stammlsg. B:* 8,4 g NaHCO₃
ad 500 ml Aqua dest.
 - Mischung:* 75 ml Lsg A + 175,4 ml Lsg B
ad 1000 ml Aqua dest.
pH 9,6 mit HCl eingestellt

<u>PBS-Puffer:</u>	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ <i>ad</i> 1000 ml Aqua dest. pH 7,2 - 7,4 mit HCl eingestellt
<u>Blockierung:</u>	PBS-Puffer 1 % (w/v) BSA
<u>Waschpuffer:</u>	1000 ml PBS-Puffer 0,05 % (v/v) Tween® 20

2.2 Methoden

2.2.1 Keratinozyten

Für die Versuche wurden primäre humane Keratinozyten der Firma Promocell, Heidelberg erworben, die aus juveniler Vorhaut gewonnen wurden. Die Zellen wurden in 75 cm² großen Zellkulturflaschen mit 15 ml serumfreiem KGM2 bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Alle Arbeiten zur Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

2.2.2 Subkultivierung der Keratinozyten

Keratinozyten der Passage 1 und 2 wurden subkultiviert, um die Zellmenge zu vergrößern. Zellen der 3. Passage wurden zur Durchführung der Stimulationsversuche verwendet.

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte bei 80 % Konfluenz des Zellrasens, um eine Wachstumsinhibition zu vermeiden. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit Spülpuffer gewaschen und 3 ml einer Trypsin-Lösung zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde mikroskopisch der Ablösegrad der Zellen begutachtet. Nachdem die Zellen vom Flaschenboden gelöst waren, wurden 3 ml einer TNS-Lösung zur Beendigung der proteolytischen Reaktion zugegeben. Der Inhalt der Kulturflasche wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 Umdrehungen pro Minute (UpM) und RT für 5 Minuten (Min.) zentrifugiert, der entstandene Überstand abgesaugt. Bei Zellen der Passage 1 und 2 wurde hier das entstandene Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert, in sterile, mit 14 ml vorgewärmtem Medium befüllte Kulturflaschen pipettiert und die Zellen erneut kultiviert. Zellen der Passage 3 wurden direkt für die Stimulationsversuche (s. Abschnitt 2.2.3) verwendet.

2.2.3 Stimulationsexperimente

Für die Experimente wurden primäre Keratinozyten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml in 24-Loch-Kulturplatten mit einem Volumen von 1 ml pro Kavität ausgesät. Zur Stimulation wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat in die Platte einmal mit Spülpuffer gewaschen und anschließend die Stimulationslösungen mit einem Volumen von 1 ml pro Vertiefung aufgebracht. Zur Herstellung der Stimulationslösungen für die Versuche zur Zeitkinetik wurde KGM2 mit jeweils einem der Adipokine Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin in einer Konzentration von 100 ng/ml versetzt; für die Versuche zur Dosiskinetik von Adiponektin wurden Lösungen mit 50, 100, 500 und 1000 ng/ml Adiponektin in KGM2 angefertigt. Die Stammlösungen der Adipokine wurden in Aliquots à 100 µl bei -20°C aufbewahrt und zur Benutzung innerhalb von 90 Sekunden (Sek.) im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Nach Auftrag der Adipokine wurden die Zellen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert, als Kontrolle dienten in nativem Kulturmedium inkubierte Keratinozyten. Zur Stimulation wurden jeweils Doppel-, zur Kontrolle Dreifachansätze durchgeführt. Der Einfluss verschiedener Adipokine wurde in drei unabhängigen Experimenten untersucht, die Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen von Adiponektin wurden 2-fach unabhängig durchgeführt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand aus den Vertiefungen der 24-Loch-Platte abpipettiert und 8 Min. bei 2000 UpM und 4°C zentrifugiert, um eventuell enthaltene Zellen oder Zellbestandteile abzuscheiden. Nach Überpipettieren in neue Reaktionsgefäße in Aliquots à 750 µl wurden die Proben bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C gelagert.

Nach Entfernen des Überstands aus den Vertiefungen der Kulturplatte wurden die Zellen mit TRIzol® lysiert (s. Abschnitt 2.2.4).

2.2.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Keratinozyten erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Ribaudo et al. 2001). Dafür wurden die Zellen nach Entfernung des Überstands zweimal mit Spülpuffer gewaschen und anschließend lysiert. Dazu wurden 500 µl TRIzol®-Reagenz in jede Vertiefung der 24-Loch-Platte gegeben und mehrmalig auf- und abpipettiert. TRIzol® enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol und ist in der Lage, die Zellen und Zellkomponenten zu lysieren und gleichzeitig die Integrität der RNA, unter anderem durch Inhibition von RNasen, zu erhalten. Das Lysat wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 5 Min. bei RT inkubiert und 100 µl Chloroform zugegeben. Nach gründlicher Flüssig-Flüssig-Extraktion und anschließender Zentrifugation (15 Min. bei 13.000 UpM und 4°C) resultierten drei Phasen. Die wässrige obere Phase, in der die RNA enthalten war, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, der Rest verworfen. Die

obere Phase wurde mit 250 µl Isopropanol versetzt und die RNA dadurch präzipitiert. Die Ausbeute der Fällung konnte durch Lagerung bei -20 °C für eine Stunde erhöht werden. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation für 10 Min. bei 13.000 UpM und 4 °C pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes mit 500 µl 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 11.000 UpM und 4 °C wurde das Ethanol entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Die RNA wurde mit 20 µl Aqua ad in. versetzt und zur vollständigen Lösung für 10 Min. bei 56 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -70 °C gelagert.

2.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte mithilfe eines UV/VIS-Spektrophotometers mit automatischer Quantifizierung. Die Absorption der RNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Bestimmung der Reinheit der Probe wurde der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, herangezogen: A_{260} / A_{280} . Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, andernfalls lag eine Verunreinigung der Probe z.B. durch Proteine oder Phenol vor.

2.2.6 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Zur weiteren Analyse wurde die aus den Zellen isolierte RNA in stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese Reaktion wird durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert, das zunächst an die mRNA bindet und einen ersten cDNA-Strang synthetisiert, dann die mRNA abbaut und den zweiten Strang der cDNA produziert. Zum Start der Synthese benötigt das Enzym einen Primer, ein kurzes einsträngiges Oligonukleotid mit freiem 3'-Ende, das komplementär zur RNA ist. Zu diesem Zweck wurden Oligo-Thymin (Oligo-d(T))-Primer bestehend aus 15-20 desoxygenierten Thymin-Basen (d(T)s) verwendet, die an den Poly-(A)-Schwanz (A: Adenin) am 3'-Ende der mRNA binden.

Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µg RNA, 1,5 µl 20 µM Oligo-d(T)-Primer und Aqua ad in., mit dem das Volumen des Gemischs auf 12,5 µl ergänzt wurde. Dieser Ansatz wurde in einem Thermoblock 10 Min. auf 70 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzubrechen und die Anlagerung der Primer an den RNA-Strang zu ermöglichen. Danach wurden 4 µl Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei RT), 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) als Antioxidationsmittel, 1 µl desoxygenierte Nukleotide (dNTPs) und 0,35 µl Superscript® (Reverse Transkriptase, SuperScript® II RT Set) zugegeben. Dieses Gemisch wurde für eine Stunde bei 42 °C, dem Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase, inkubiert. Durch Anlagerung der dNTPs erfolgt in diesem Schritt die Synthese der cDNA. Im Anschluss wurde der Ansatz für 5 Min. auf 90 °C erhitzt,

was zur Inaktivierung des Enzyms und damit zur Beendigung der Reaktion führte. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.7 Real-time quantitative PCR (RTq-PCR)

Zur Untersuchung der Gen-Expression der AMP wurde die aus mRNA synthetisierte cDNA in der RTq-PCR mithilfe genspezifischer Primer für Psoriasis (S100A7), RNase 7, hBD-2 und -3 amplifiziert.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein gängiges Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Segmente, die dadurch analysiert werden können. Die real-time PCR stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar und ermöglicht eine Quantifizierung der Reaktionsprodukte simultan zum Ablauf der Reaktion (Higuchi et al. 1992). Zur Vervielfältigung werden zwei spezifische Primer benötigt, die jeweils an einen der beiden komplementären Stränge der denaturierten Matrizen-DNA hybridisieren und dabei den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen. Die Synthese der neuen DNA-Doppelstränge geschieht durch eine DNA-Polymerase, deren Startpunkt die beiden Primer darstellen.

Das Prinzip der hier durchgeführten real-time TaqMan™ PCR zeigt Abb. 2. Die Besonderheit dieser Methode ist die Quantifizierung der PCR-Produkte durch Fluoreszenzmessung eines Reporter-Farbstoffs (FAM: 6-Carboxy-Fluorescein; Emission bei 518 nm), der kovalent an das 5'-Ende der TaqMan™-Sonde gebunden ist. Dieses Oligonukleotid bindet sequenzspezifisch an den zu amplifizierenden DNA-Bereich. An das 3'-Ende der Sonde ist ein weiterer fluorogener Farbstoff gebunden, der „Quencher“ (TAMRA: 6-Carboxy-tetramethylrhodamin; Emission bei 582 nm). Wird der Reporter durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, kommt es zu einer strahlungsfreien Übertragung der entstehenden Energie, einem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), auf den Quencher. Dann ist lediglich die Fluoreszenz des Quenchers, jedoch kein Signal vom Reporter messbar. Sind Reporter und Quencher mehr als einige Nanometer voneinander entfernt, kann dieser Vorgang nicht ablaufen und der Reporter gibt seine Energie als Fluoreszenz ab. Zur Entfernung der beiden Farbstoffe voneinander kommt es, wenn die TaqMan™-Sonde während der Doppelstrang-Synthese durch die DNA-Polymerase hydrolysiert wird. Diese synthetisiert in 5'-3'-Richtung und besitzt zusätzlich eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität, mit der sie die hybridisierte TaqMan™-Sonde zerschneidet. So entfernen sich Reporter und Quencher voneinander, der Energietransfer kann nicht mehr ablaufen und die Fluoreszenz des Reporters steigt an. Die Messung der Reporter-Fluoreszenz erfolgte nach jedem Amplifikationszyklus.

Die TaqMan™-Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, da es durch die verwendete TaqMan™-Sonde ausschließlich zum Nachweis von Amplifikaten des Zielbereichs kommt (Arikawa et al. 2008). Durch den hohen Grad der Automatisierung des Prozesses und durch den Zeitpunkt der

Datenerhebung können außerdem präzise und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden (Jung et al. 2000, Hoebeck et al. 2007).

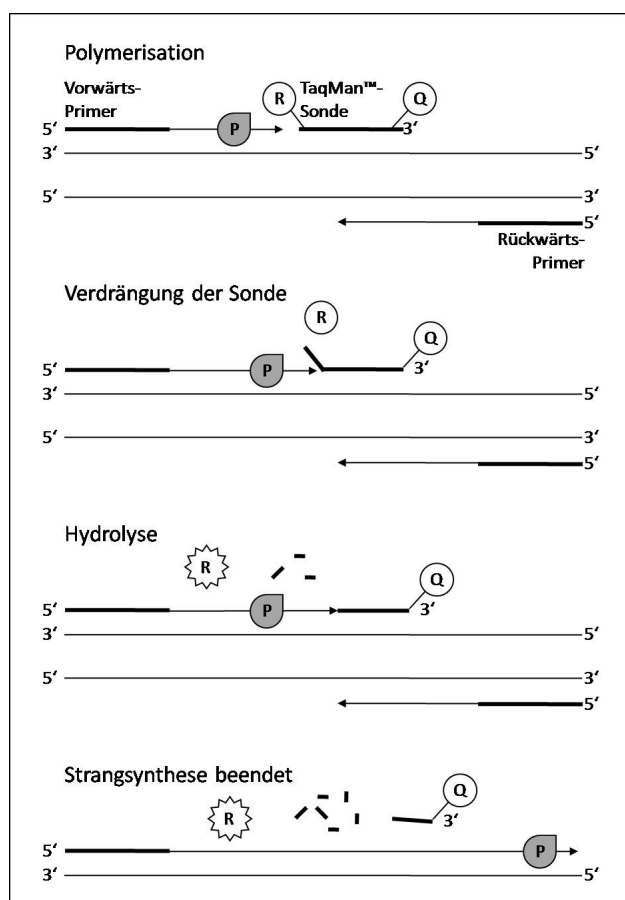


Abb. 2 Schematische Darstellung des Prinzips der real-time TaqMan™ PCR.

R = Reporter

Q = Quencher

P = DNA-Polymerase

[Quelle: modifiziert nach „Real-Time PCR Vs. Traditional PCR“ Online Tutorial, Applied Biosystems 2002, S. 13]

Zur Durchführung der PCR wurden 10 µl TaqMan™ Universal PCR Master Mix, 5 µl cDNA und 1 µl Primer in jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte pipettiert und das Volumen mit 4 µl Aqua ad in. zu 20 µl ergänzt. Tab. 2 zeigt die Einstellungen, mit denen die verschiedenen Zyklen der PCR in einer dafür vorgesehenen PCR-Plattform durchgeführt wurden.

Um Unterschiede der RNA-Gesamtmenge und -Qualität auszugleichen, wurde in jedem PCR-Lauf ein Referenz-Gen amplifiziert. Dazu wurde das Gen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) gewählt. Dieses Enzym ist Bestandteil des „salvage pathway“ zur Wiederverwertung von Purinbasen. Es wird konstant exprimiert, unterliegt keiner äußeren Regulation und dient der Erhaltung der Zelle (Jiralerspong und Patel 1996).

Zur Normalisierung störender Fluktuationen der Emission wurde außerdem die Fluoreszenz eines passiven Referenzfarbstoffs (ROX: 6-Carboxy-X-rhodamin, Emission bei 602 nm) gemessen, der in dem Reaktionsansatz enthalten war.

Reaktionsschritt	Bedingungen	Anzahl der Wiederholungen
Initialisierung der Reaktion	2 Min., 50 °C	1
Denaturierung des Matrizenstrangs	10 Min., 95 °C	1
Hybridisierung und Elongation	1 Min., 60°C	} 45
Denaturierung der Syntheseprodukte	15 Sek., 95°C	

Tab. 2 Einstellungen und Reaktionsschritte der real-time TaqMan™ PCR.

2.2.8 Quantifizierungsmethode

Zur relativen Quantifizierung der Gen-Expression wurde der C_T -Wert (*threshold cycle*) herangezogen. Zur Bestimmung dieses Werts wurde in dem Anstiegsbereich der exponentiellen Phase der PCR ein Schwellenwert (*threshold*) festgelegt und für jede einzelne Amplifikationskurve gemessen, bei welcher Zyklen-Anzahl das Fluoreszenz-Signal diesen Schwellenwert überschreitet (vgl. Abb. 3).

Die Messung wurde in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, während der das Matrizen-Material pro Zyklus genau verdoppelt wird. Diese Methode liefert präzisere Werte als Endpunktbestimmungen (Kubista et al. 2006).

Zur Normalisierung der Werte hinsichtlich unterschiedlicher RNA-Gesamtmenen wurde aus dem C_T -Wert der ΔC_T -Wert berechnet, indem von dem C_T -Wert der einzelnen amplifizierten Gene der Wert des Referenz-Gens HPRT der jeweiligen Probe abgezogen wurde:

$$C_T\text{-Wert AMP (Probe A)} - C_T\text{-Wert HPRT (Probe A)} = \Delta C_T\text{-Wert (Probe A)}.$$

Zur weiteren Analyse der Ergebnisse wurden als $\Delta\Delta C_T$ bezeichnete Werte errechnet, mit denen die Gen-Expression der Proben mit denen der Kontrollen ins Verhältnis gesetzt werden. Dazu wurde von

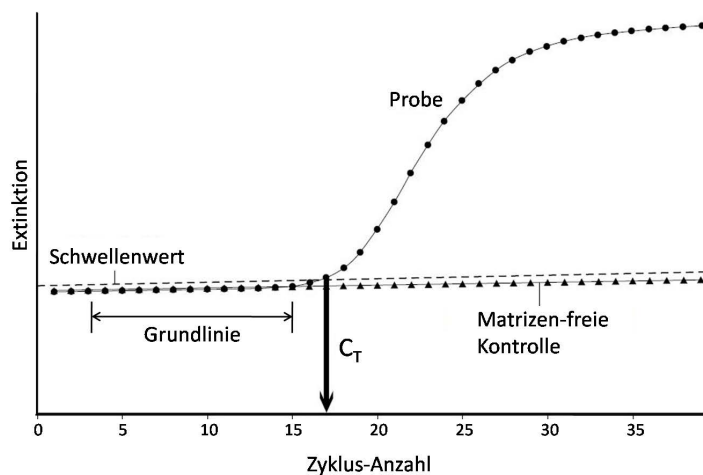


Abb. 3 Schematische Darstellung zur Ermittlung des C_T -Werts während der PCR.

Halblogarithmische Auftragung des Fluoreszenzsignals (Ordinate) über der Zyklenzahl (Abszisse).

[Quelle: modifiziert nach: „TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol“ Online Tutorial, Applied Biosystems 2002, S. 52]

dem ΔC_T -Wert der Probe der Wert der zugehörigen Kontrolle abgezogen:

$$\Delta C_T\text{-Wert (Probe A)} - \Delta C_T\text{-Wert (Kontrolle)} = \Delta\Delta C_T\text{-Wert (Probe A)}.$$

Unter der Annahme, dass sich in einem nachfolgenden Zyklus bei der exponentiell verlaufenden PCR-Reaktion eine Verdoppelung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus ergibt, wird die Expression des Transkripts in Probe A relativ zu dem in Probe B als

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

definiert (Winer et al. 1999). Diese Werte wurden, mit dem Faktor 1000 multipliziert, zur Darstellung der Ergebnisse verwendet. Durch den angewendeten Rechenweg ergab sich für alle Kontrollen eine relative mRNA-Expression von 1000. Um im Rahmen von vergleichenden RTq-PCR-Messungen von einer Regulation der mRNA-Expression zu sprechen, sollte sich die Gen-Expression der Probe mindestens um den Faktor 2 von der der Kontrolle unterscheiden (Applied Biosystems 2010).

2.2.9 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)

Zum Nachweis der antimikrobiellen Peptide RNase 7 und hBD-3 in den Zellkulturüberständen wurde ein enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) in „Double-Antibody-Sandwich-ELISA-Technik“ verwendet, bei der es zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes („Sandwich“) kommt (Abb. 4). Dabei wird das zu detektierende Antigen zunächst an einen primären Antikörper (PAK) gebunden und anschließend mit einem sekundären Antikörper (SAK) markiert, der seinerseits an Biotin gekoppelt ist. Im Folgenden wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugeführt, dessen Streptavidin-Einheit an das Biotin-Molekül des SAK bindet. Peroxidase ist ein Enzym, das die Reduktion von Peroxiden katalysiert. Sein Substrat, ABTS, wird im nächsten Schritt zugegeben. ABTS ist ein Redoxindikator, der leicht in stabile Radikale gespalten werden kann. Diese Radikale können photometrisch nachgewiesen werden. Damit wird die Anwesenheit des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes angezeigt und kann anhand einer Eichkurve, die mithilfe von Standardlösungen mit bekannter Antigenkonzentration erstellt wird, quantifiziert werden.

Durch die hohe Bindungsstärke und Spezifität der Wechselwirkung zwischen Antigenen und Antikörpern sind die Immunoassays, zu denen der ELISA-Test zählt, als hoch spezifisch und hinsichtlich der nachzuweisenden Analytmenge als äußerst sensitiv anzusehen (Gey 2008).

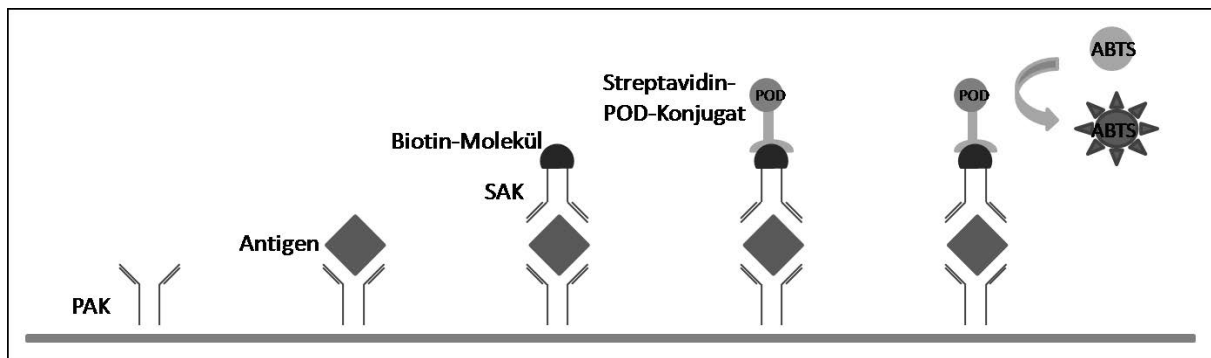


Abb. 4 Schematische Darstellung des Prinzips eines Sandwich-ELISA.

[Quelle: modifiziert nach „Biochemie“ W. Müller-Esterl, 2004 (Elsevier Verlag 1. Auflage), S. 114]

Zur Vorbereitung wurden die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte mit dem PAK beschichtet. Dazu wurden die Antikörper mit 0,05 M Carbonatpuffer verdünnt und ein Volumen von 50 µl in jedes Loch pipettiert. Anschließend wurden die Platten abgedeckt und über Nacht bei 4 °C (RNase 7) bzw. bei RT (hBD-3) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Flüssigkeit aus den Versuchsfeldern verworfen und durch 200 µl einer Blockierungslösung ersetzt. Bei diesem Schritt, der der Absättigung nicht besetzter Bindungsstellen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte dient, betrug die Inkubationszeit für RNase 7 eine Stunde bei 37 °C, für hBD-3 zwei Stunden bei RT.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit entfernt und die Kavitäten der Platte dreimal mit Waschpuffer in einem Waschergerät für Mikrotiterplatten gewaschen.

Parallel wurden aus einer Stammlösung mit bekannter Antigen-Konzentration durch serielle Verdünnung Standardlösungen in den Konzentrationen 40 bis 0,3125 ng/ml für RNase 7 und 80 bis 1,25 ng/ml für hBD-3 erstellt. Zur Herstellung der Lösungen wurde das zur Zellkultur verwendete Medium mit 1 % (w/v) BSA versetzt und steril filtriert. Diese Lösung wurde außerdem als Negativ-Kontrolle pipettiert.

Die zu untersuchenden Proben wurden zeitnah aufgetaut, gemischt und 8 Min. lang bei 22 °C und 1000 UpM zentrifugiert, um Messfehler durch Zellbestandteile zu verhindern.

Nach Entfernen der Blockierungslösung folgte das Aufbringen von je 50 µl der zu untersuchenden Kulturüberstände und Standards pro Vertiefung. Dabei wurden die Proben doppelt, die Standardlösungen und Negativ-Kontrollen dreifach eingesetzt. Nach dem Antigen-Auftrag wurden die Platten bei RT für eine halbe Stunde (RNase 7) bzw. zwei Stunden (hBD-3) inkubiert.

Es folgte ein weiterer Waschschrift (3x), nach dem 50 µl des SAK aufgebracht wurden. Anschließend folgten 30 Min. Inkubation bei 37 °C (RNase7) bzw. eine Stunde bei RT (hBD-3).

Im Folgenden wurden 50 µl des Streptavidin-POD-Konjugats aufgetragen. Vorher wurde die Flüssigkeit aus den Versuchsfeldern entfernt und die Mikrotiterplatte erneut dreimal gewaschen, danach wurde 30 Min. lang bei 37 °C (RNase7) bzw. bei RT (hBD-3) inkubiert.

Anschließend wurde die Flüssigkeit verworfen, die Platte sechsmal gewaschen und 50 µl ABTS in jede Vertiefung pipettiert. Bei homolytischer Spaltung von ABTS durch die Peroxidase entsteht ein grün gefärbtes Radikal-Kation, dessen Extinktion bei 405 nm photometrisch nachweisbar ist.

Nachdem ein makroskopisch sichtbarer Farbumschlag erfolgt war, wurde mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 405 nm Wellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 492 nm die Extinktion der Reaktionsansätze bestimmt, bis die optische Dichte des höchsten Standards annähernd 1 betrug.

Anhand der Extinktionsmittelwerte der Standards wurde eine Standardkurve erstellt, in Abb. 5 beispielhaft mit Werten eines hBD-3-ELISAs abgebildet. Mithilfe der Funktionsgleichung der Standardkurve konnte dann die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden, indem der Extinktionswert jeder Probe anstelle der x-Variablen in die Gleichung eingesetzt wurde. Zur Auswertung wurde das Programm Excel 2010 für Windows (Microsoft® Coporation, Redmond (USA)) verwendet.

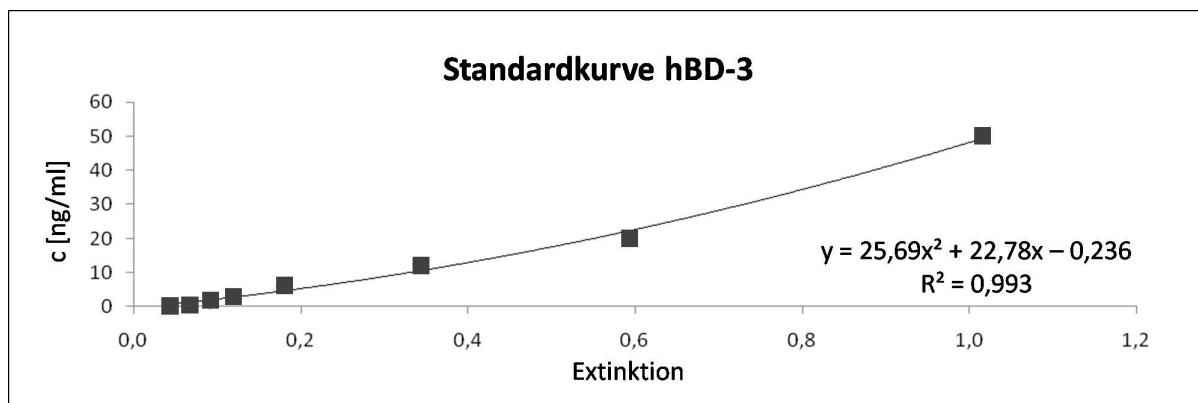


Abb. 5 Beispiel einer ELISA-Standardkurve zur Berechnung der Proteinkonzentration.

2.2.10 Statistische Analyse

Die Untersuchungsergebnisse wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben analysiert. Mithilfe dieses Verfahrens, das zu den Hypothesentests mit t-verteilter Testprüfgröße gehört, können Mittelwerte zweier Gruppen, die sich hinsichtlich einer nominalen Variable (hier „stimuliert“ und „nicht stimuliert“) unterscheiden, miteinander verglichen werden (McDonald 2009). Dabei gilt als Nullhypothese, dass die Mittelwerte beider Gruppen gleich sind. Als Maß für die Diskrepanz zwischen den Daten und der Nullhypothese wurde der p-Wert herangezogen, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die Prüfgröße den beobachteten oder einen noch unwahrscheinlicheren Wert annimmt, wenn die Nullhypothese zutrifft. Werte mit einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen, was einem Konfidenzintervall von 5 % entspricht. Damit

liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit hinsichtlich des Verwerfens der Nullhypothese unter 5 %. Die Nullhypothese ist abzulehnen, wenn der beobachtete Wert innerhalb des Konfidenzintervalls liegt.

Für die statistischen Berechnungen und Grafiken wurde Excel 2010 für Windows verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Experimenteller Aufbau und Datengewinnung

Um den Einfluss von Adipokinen auf die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) durch Keratinozyten zu untersuchen, wurde im ersten Versuchsteil die Zeitkinetik einer möglichen Reaktion analysiert. In Anlehnung an Arbeiten anderer Forschungsgruppen wurden primäre Keratinozyten in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils einem der vier Adipokine Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin in einer Konzentration von 100 ng/ml für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten in Nährmedium kultivierte Keratinozyten. Die stimulierten Proben wurden dabei als Doppel-, die Kontrollen als Dreifachansätze angelegt. Mittels quantitativer real-time PCR (RTq-PCR) wurde anschließend die relative Gen-Expression der AMP Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3 durch die Keratinozyten analysiert. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zur Zeitkinetik sind in den Abbildungen 6 a-d dargestellt.

Im Anschluss an die Untersuchung der mRNA-Expression wurden die Ansätze, die einen Hinweis auf einen regulativen Einfluss der Adipokine zeigten, auch hinsichtlich der Protein-Sekretion der entsprechenden AMP mittels ELISA untersucht. In den Überständen des dritten unabhängigen Versuchs gelang auch nach Wiederholung des Tests kein Nachweis von RNase 7, diese Proben wurden mit dem Wert der unteren Nachweisgrenze (0,3 ng/ml) in die grafische und statistische Auswertung einbezogen. Die Ergebnisse der ELISA-Tests sind in den Abbildungen 7 a-h dargestellt.

In einem weiteren Versuchsteil wurde die Dosisabhängigkeit des beobachteten Effekts untersucht. Dazu wurde exemplarisch das Adipokin Adiponektin gewählt, das in den Zeitkinetik-Versuchen die stärkste Expressionsveränderung bewirkte. Hier wurden primäre Keratinozyten für 24, 48 und 72 Stunden mit verschiedenen Dosierungen (50, 100, 500 und 1000 ng/ml) von Adiponektin inkubiert und mittels RTq-PCR die Gen-Expression von Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und -3 untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 8 a-d als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen, jeweils mit Doppelansätzen für die stimulierten Proben und Dreifachansätzen für die Kontrollen, dargestellt.

Bei der Auswertung der o.g. Untersuchungen fiel auf, dass sich die drei verwendeten Zellchargen hinsichtlich des Expressionsniveaus der AMP deutlich voneinander unterschieden. Dieses ist in Abb. 9 a-f dargestellt. Abgebildet sind die RNase 7- und hBD-3-Expressionen der verschiedenen Zellchargen nach Stimulation.

3.2 Zeitkinetik: Ergebnisdarstellung und Analyse

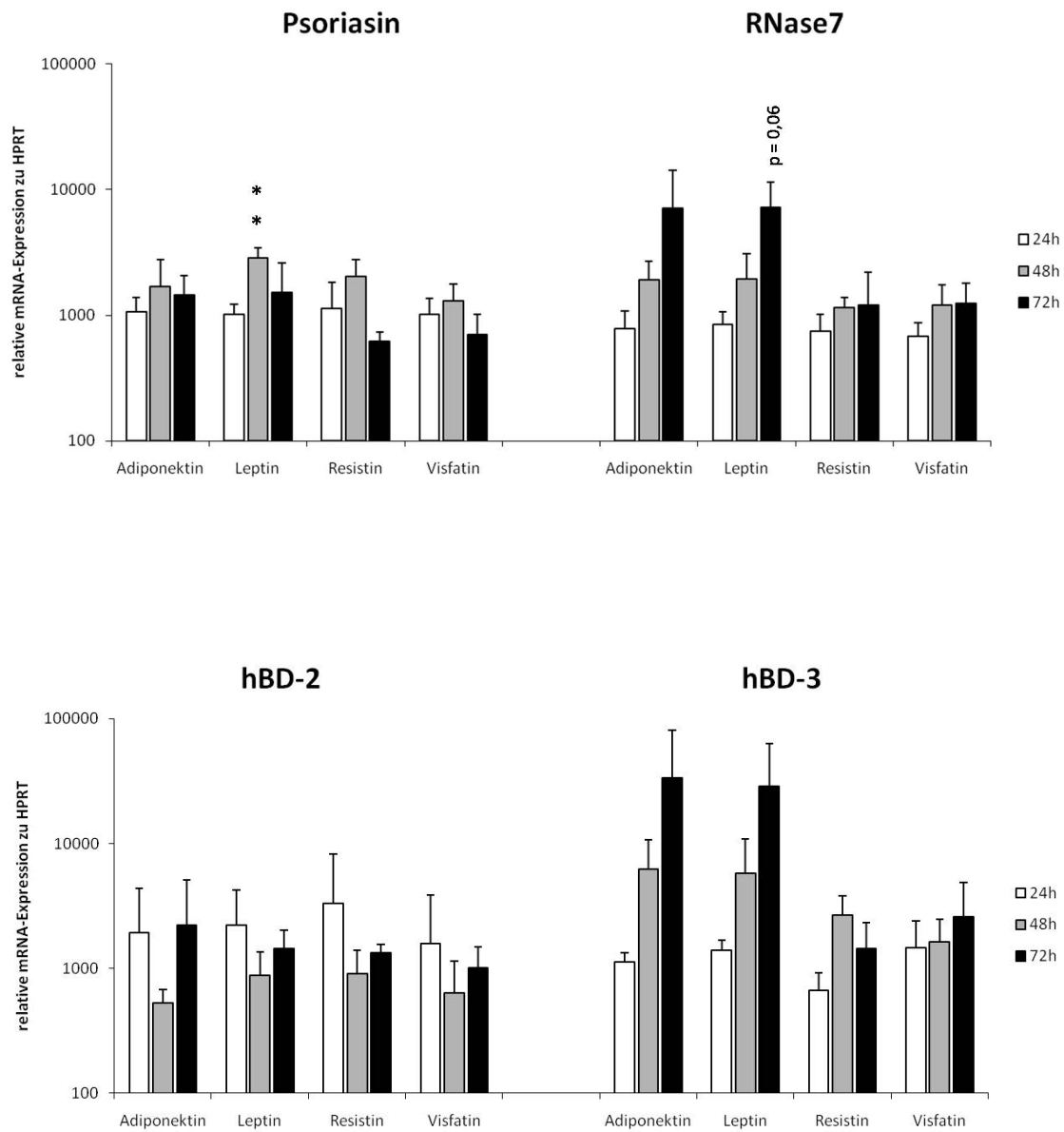


Abb. 6 a-d Zeitabhängige mRNA-Expression der AMP Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3 nach Inkubation von primären Keratinozyten mit je 100 ng/ml der genannten Adipokine.

Die Diagramme zeigen die $\Delta\Delta C_T$ -Werte der relativen mRNA-Expression als Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen HPRT. Kontrolle = 1000. ** $p \leq 0,01$.

Die Gen-Expression von RNase 7 und hBD-3 ist nach 72-stündiger Inkubation mit Adiponektin und Leptin erhöht

Psoriasisin-mRNA-Expression (Abb. 6a)

Abb. 6 a zeigt die Psoriasisin-mRNA-Expression durch primäre Keratinozyten nach Inkubation mit Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin für 24, 48 und 72 Stunden als Mittelwert aus drei Versuchen. Hier findet sich in dem mit Resistin stimulierten Ansatz nach 48-stündiger Inkubation eine Verdopplung der relativen mRNA-Expression (2036) im Vergleich zur Kontrolle (1000). Nach Stimulation mit Leptin für 48 Stunden ist die Expression um das 2,8-fache erhöht (2841); diese Expressionsänderung ist signifikant ($p \leq 0,01$). Die Psoriasisin-mRNA-Expression aller anderen Ansätze befindet sich im Niveau der Kontrolle.

RNase7-mRNA-Expression (Abb. 6b)

Bei den mit Adiponektin stimulierten Ansätzen findet sich nach 48 Stunden eine Verdopplung der mRNA-Expression (1916) im Vergleich zur Kontrolle (1000), nach 72 Stunden ist die Expression siebenfach erhöht (7028). Das gleiche Expressionsmuster findet sich bei den mit Leptin inkubierten Proben (nach 48 Stunden Verdopplung: 1935; nach 72 Stunden siebenfache Erhöhung: 7150; $p = 0,06$). In den mit Resistin und Visfatin inkubierten Ansätzen findet sich keine wesentliche Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle.

hBD-2-mRNA-Expression (Abb. 6c)

Nach Inkubation mit Adiponektin findet sich sowohl nach 24 als auch nach 72 Stunden eine Verdopplung der Expression (1932 bzw. 2225). Auch nach 24-stündiger Inkubation mit Resistin ist die mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle um das Dreifache erhöht (3315), nach Stimulation mit Leptin für 24 Stunden um das Doppelte (2203). Die hBD-2-mRNA-Expression der weiteren Ansätze entspricht der der Kontrolle.

hBD-3-mRNA-Expression (Abb. 6d)

Hier findet sich bei den mit Adiponektin inkubierten Ansätzen nach 48 Stunden eine sechsfache Erhöhung der mRNA-Expression (6204), nach 72 Stunden ist die Expression im Vergleich zur Kontrolle 33-fach erhöht (33304). Bei den mit Leptin inkubierten Proben findet sich ein ähnliches Muster, hier ist die Expression der hBD-3-mRNA nach 48 Stunden 5,8-fach (5778), nach 72 Stunden 28-fach erhöht (28525).

Die Expression der mit Resistin inkubierten Ansätze ist nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt (2479), bei den mit Visfatin behandelten Proben findet sich eine Verdopplung nach 72

Stunden Inkubation (2596). In den weiteren Ansätzen ist die Expression der hBD-3-mRNA im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert.

Zusammenfassend treten im Rahmen dieser Arbeit die Ansätze hervor, die für 72 Stunden mit Adiponektin und Leptin inkubiert wurden, da deren relative mRNA-Expression im Vergleich zur Expression der Kontrolle deutlich erhöht war (7-fache Induktion von RNase 7, sowie 28- bzw. 33-fache Induktion von hBD-3 nach Inkubation mit Adiponektin bzw. Leptin).

Für die Gen-Expression von Psoriasin und hBD-2 konnte keine oder allenfalls eine schwache Regulation gezeigt werden.

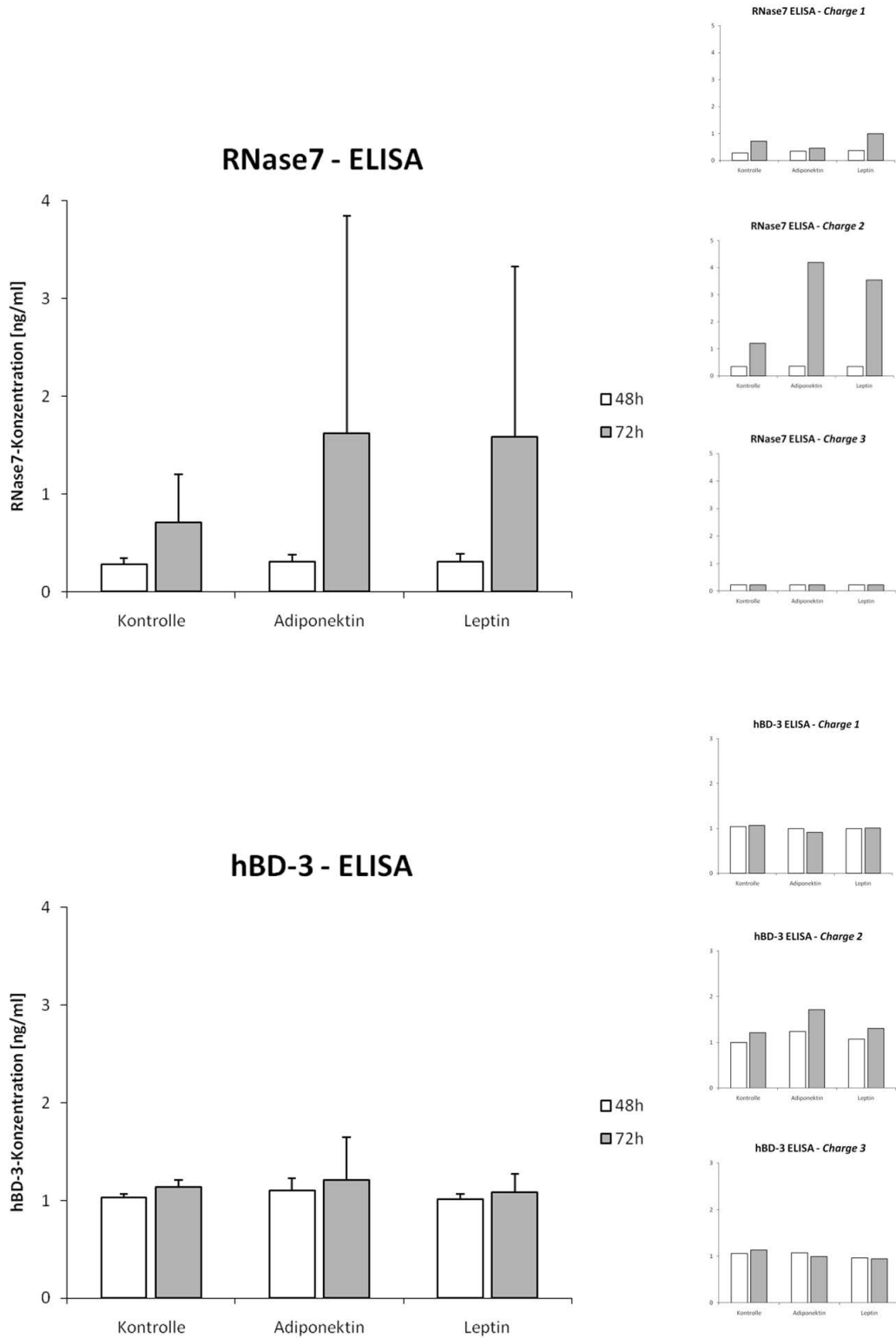


Abb. 7 a-h Proteinkonzentrationen der AMP RNase 7 und hBD-3 in Zellkulturüberständen nach Inkubation von primären Keratinozyten mit 100 ng/ml Adiponektin und Leptin für 48 und 72 Stunden. Dargestellt sind die Proteinkonzentrationen in ng/ml. Die linke Spalte zeigt Mittelwerte der Proteinkonzentration aus drei unabhängigen Versuchen, in der rechten Spalte sind die drei Versuche einzeln dargestellt.

Die Sekretion von RNase 7 ist nach 72-stündiger Inkubation mit Adiponektin und Leptin erhöht

In den Experimenten zur Zeitkinetik wiesen die Proben, die für 72 Stunden mit Adiponektin oder Leptin behandelt wurden, die deutlichsten Veränderungen hinsichtlich der mRNA-Expression von RNase 7 und hBD-3 auf, daher wurde der Proteingehalt in den Zellkulturüberständen dieser und der für 48 Stunden inkubierten Proben mittels ELISA untersucht.

RNase 7-Sekretion (Abb. 7 a-d)

Der RNase 7-Gehalt der 48 Stunden inkubierten Proben unterscheidet sich nicht von der der Kontrolle. Nach 72-stündiger Inkubation zeigte sich in beiden Ansätzen eine Induktion der Proteinexpression um das Doppelte (Adiponektin: 1,62 ng/ml; Leptin: 1,59 ng/ml; Kontrolle 0,71 ng/ml).

hBD-3-Sekretion (Abb. 7 e-h)

Es zeigt sich zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der Proteinsekretion der stimulierten Proben im Vergleich zur Mediumkontrolle.

3.3 Dosiskinetik: Ergebnisdarstellung und Analyse

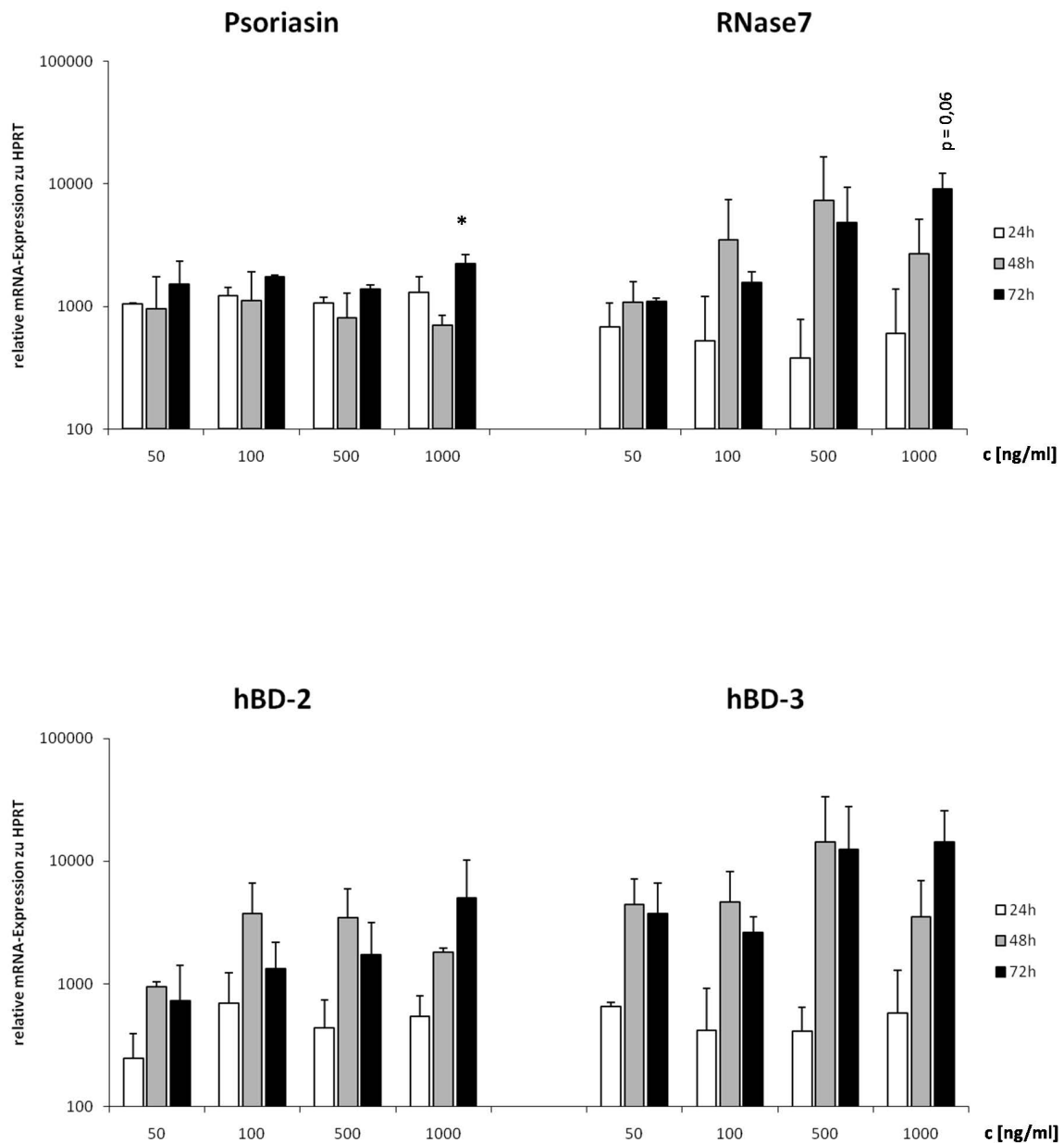


Abb. 8 a-d Dosisabhängige mRNA-Expression der AMP Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3 nach Inkubation von primären Keratinozyten mit Adiponektin in den angegebenen Konzentrationen. Dargestellt sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte der relativen mRNA-Expression als Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen HPRT. Kontrolle = 1000.* $p \leq 0,05$.

Die Gen-Expression von RNase 7, hBD-2 und hBD-3 wird dosisabhängig durch Adiponektin beeinflusst

Psoriasisin-mRNA-Expression (Abb. 8a)

Nach 72-stündiger Inkubation der Zellen mit 1000 ng/ml Adiponektin ist eine Verdopplung der relativen mRNA-Expression (2231) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu beobachten, diese Veränderung ist signifikant ($p < 0,05$). Die Gen-Expression aller weiteren Ansätze liegt im Expressionsniveau der Kontrolle.

RNase 7-mRNA-Expression (Abb. 8b)

Nach Inkubation mit 50 ng/ml Adiponektin ist keine Veränderung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Die mit 100 ng/ml inkubierten Zellen exprimieren nach 48 Stunden etwa 3,5mal soviel RNase 7-mRNA (3497) wie die Kontrolle. Nach Stimulation mit 500 ng/ml für 48 Stunden findet sich eine 7-fache Induktion der RNase 7-mRNA (7358), nach 72 Stunden Inkubation ist die Gen-Expression in diesem Ansatz noch knapp 5-fach erhöht (4868). Bei Inkubation mit 1000 ng/ml ist eine Verdreifachung der mRNA-Expression nach 48 Stunden (2704) nachweisbar, nach 72 Stunden Stimulation ist die Gen-Expression 9-fach induziert (9182). Der p-Wert dieses 72 Stunden-Ansatzes liegt bei 0,06 und befindet sich damit nur knapp außerhalb des 95 % -Konfidenzintervalls ($p < 0,05$).

hBD-2-mRNA-Expression (Abb. 8c)

Bei den mit 100 ng/ml Adiponektin stimulierten Zellen ist eine knapp vervierfachte mRNA-Expression (3750) nach 48 Stunden zu beobachten, nach 24 und 72 Stunden besteht kein Unterschied zur Kontrolle. Nach Inkubation mit 500 ng/ml des Adipokins induzieren die Zellen nach 48 Stunden hBD-2-mRNA 3,5-fach im Vergleich zur Kontrolle (3454). Die Gen-Expression nach 72 Stunden ist gegenüber der der Kontrolle jedoch unverändert. Bei dem mit 1000 ng/ml behandelten Ansatz findet sich nach 48 Stunden eine knappe Verdopplung der mRNA-Expression (1811) gegenüber der Kontrolle, nach 72 Stunden ist die Expression verfünffacht (5045).

hBD-3-mRNA-Expression (Abb. 8d)

Die mit 50 ng/ml Adiponektin inkubierten Zellen produzieren nach 48 Stunden ein Vierfaches der relativen mRNA-Expression der Kontrolle (4414), ebenso nach 72 Stunden Inkubation (3755). Bei dem mit 100 ng/ml stimulierten Ansatz findet sich nach 48 Stunden ein 4-Faches der Expression der Kontrolle (4632). Die mRNA-Expression nach 72-stündiger Inkubation ist gegenüber der Kontrolle 2,6-fach erhöht (2628). Nach Inkubation mit 500 ng/ml Adiponektin für 48 und 72 Stunden kommt es zu einer stärkeren Induktion: nach 48 Stunden ist die Expression 14-fach (14434), nach 72 Stunden 12-

fach (12528) erhöht. Auch nach Stimulation mit 1000 ng/ml ist die Gen-Expression von hBD-3 vermehrt. Nach 48 Stunden findet sich eine Erhöhung um den Faktor 3,5 (3507), nach 72 Stunden ist die mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle 14-fach gesteigert (14406).

Mit Ausnahme der 72 Stunden-Werte der Psoriasin- und RNase 7-Expression nach Inkubation mit 1000 ng/ml Adiponektin liegen alle Ergebnisse der Dosiskinetik außerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls ($p > 0,05$) und sind daher statistisch nicht signifikant.

3.4 Expressionsunterschiede zwischen den Keratinozyten-Chargen

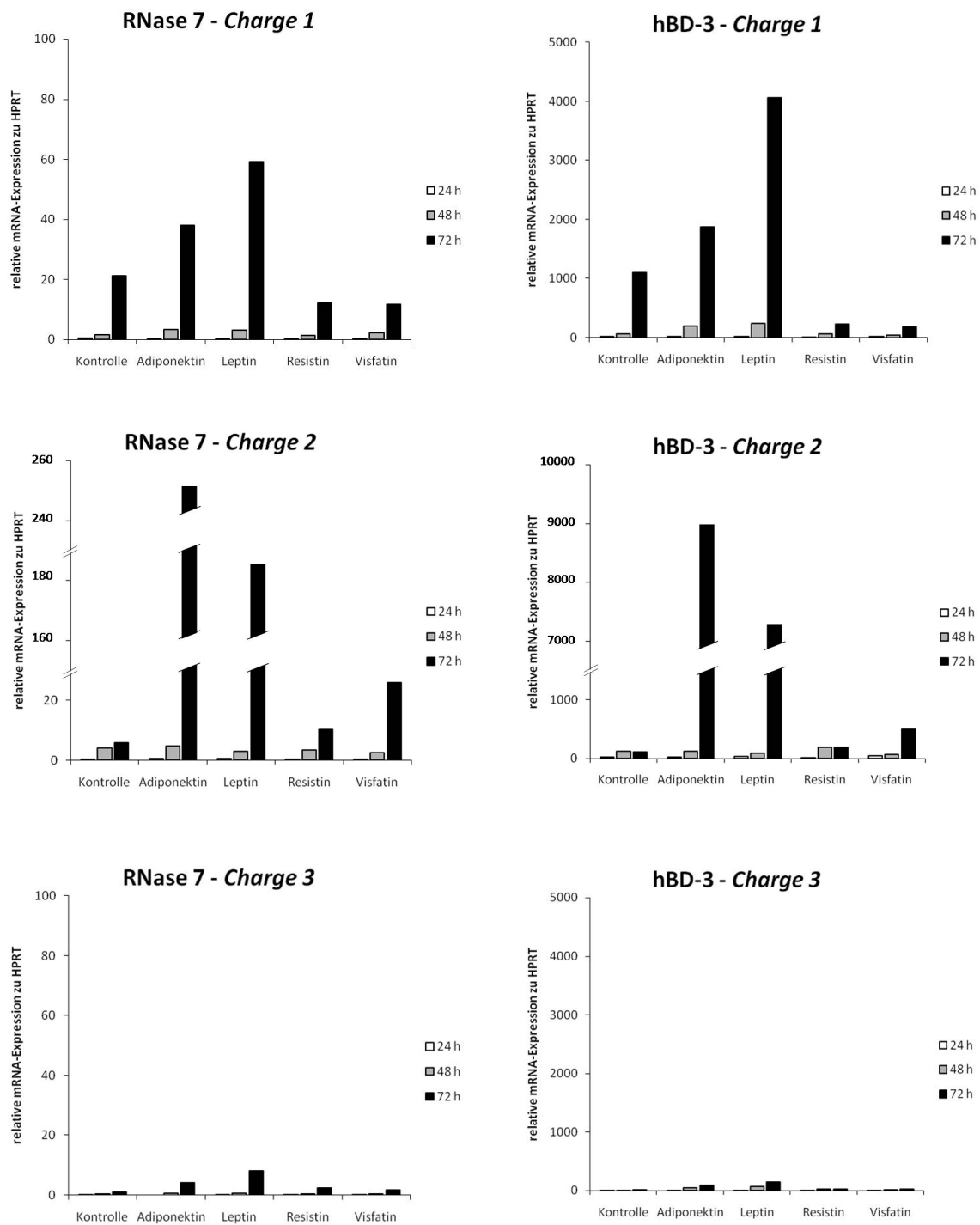


Abb. 9 a-f Zeitabhängige RNase 7- (linke Spalte) und hBD-3-mRNA Expression (rechte Spalte) der verwendeten Zellchargen nach Inkubation von primären Keratinozyten mit den angegebenen Adipokinen.

Dargestellt sind die ΔC_T -Werte der relativen mRNA-Expression, die nicht durch die Kontrolle relativiert wurden, die Expression der Kontrolle ist daher separat abgebildet. Die mRNA-Expression wurde mit dem Housekeeping-Gen HPRT normalisiert.

Verschiedene Keratinozyten-Chargen unterscheiden sich hinsichtlich der Höhe der Gen-Expression der analysierten AMP

Wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben, wurden drei unabhängige Versuche zur Zeitkinetik der Wirkung von Adipokinen auf die Expression von AMP durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Chargen von primären Keratinozyten der Firma Promocell, Heidelberg, verwendet. Bei der Auswertung der Ergebnisse fällt auf, dass die Chargen sich hinsichtlich ihres durchschnittlichen Expressionsniveaus deutlich voneinander unterscheiden. Diese wichtige Beobachtung ist in Abb. 9 a-f anhand der RNase 7- und hBD-3-Expression der verschiedenen Zellchargen dargestellt.

Trotz dieser Unterschiede im generellen Expressionsniveau findet sich in allen drei Versuchen ein ähnliches Expressionsmuster, so ist in jedem der Versuche eine erhöhte Expression von RNase 7 und hBD-3 nach 72-stündiger Inkubation mit Adiponektin und Leptin nachweisbar. Es zeigt sich, dass die Zellen der Charge 2 die höchste durchschnittliche Expression aufweisen, während die Keratinozyten aus Versuch 3 eine deutlich geringere AMP-Expression aufweisen als die beiden anderen Chargen.

4. Diskussion

Die veränderte Freisetzung von Adipokinen und antimikrobiellen Peptiden (AMP) bei Psoriasis stellt aktuell eine Beobachtung dar, deren Bedeutung noch weitgehend unklar ist. Die Veränderungen des Adipokin-Profiles werden beispielsweise mit der Entwicklung sekundärer, vor allem metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht, während für die AMP bereits Hinweise auf eine Beteiligung an der Pathogenese der Psoriasis vorliegen (Gerdes et al. 2011, Harder et al. 2007). Von großer Bedeutung ist, dass die Begleiterkrankungen der Schuppenflechte einen großen Einfluss auf die Morbidität und die Mortalität der Erkrankung haben (Mrowietz et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund entstand die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, in der untersucht werden sollte, ob Adipokine die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden durch Keratinozyten direkt beeinflussen können. Bisher gab es in der aktuellen Literatur hierzu keine Daten. Zur Untersuchung der Fragestellung wurden Keratinozyten für unterschiedliche Zeiträume mit verschiedenen Adipokinen inkubiert und anschließend auf die mRNA-Expression und die Sekretion von mehreren antimikrobiellen Peptiden untersucht.

4.1 Konzentration der verwendeten Adipokine

Bei der Planung des experimentellen Aufbaus stellte sich die Frage nach der/den zu verwendenden Konzentration/en der Adipokine, mit denen die Keratinozyten inkubiert werden sollten. Zur Orientierung wurden Arbeiten anderer Forschungsgruppen herangezogen, in denen Zellkulturen – optimal Keratinozyten – mit Adipokinen inkubiert wurden. Die bereits bekannten Serumlevel der Adipokine wurden hingegen nicht als Richtwerte herangezogen, da diese sich deutlich von den bisher *in vitro* verwendeten Konzentrationen unterscheiden: so liegt beispielsweise die durchschnittliche Serumkonzentration von Adiponektin im Bereich von 7-18 µg/ml, während für Zellkultur-Experimente mehrheitlich Konzentrationen im Nanogramm-Bereich verwendet wurden (Considine et al. 1996, Adamczak et al. 2003, Ingelsson et al. 2007, Chen et al. 2009).

Für Adiponektin finden sich verschiedene Arbeiten, in denen Zellen wie Skelett- und glatte Muskelzellen mit 100 ng/ml inkubiert wurden (Civitarese et al. 2006, Shin et al. 2008). Kawai und Kollegen wiesen bei Inkubation von immortalisierten Keratinozyten mit bis zu 30 µg/ml eine erhöhte Apoptoserate nach (Kawai et al. 2008), während Takahashi *et al.* zeigen konnten dass Konzentrationen zwischen 1 und 10 µM keinen Einfluss auf die Proliferation von primären Keratinozyten hatten (Takahashi et al. 2010). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Konzentrationen die Sekretion verschiedener Mediatorstoffe durch die Zellen beeinflussen können.

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde Adiponektin für die Versuche der vorliegenden Arbeit zunächst in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet.

Für Leptin finden sich in der aktuellen Literatur verschiedene Beschreibungen von Inkubationsexperimenten mit Keratinozyten, wobei Leptin im Mittel in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet wurde (Frank et al. 2000, Goren et al. 2003). Kanda und Watanabe untersuchten 2008 den Einfluss von Leptin auf die Produktion von humanem β -Defensin (hBD) -2 durch primäre Keratinozyten und stimulierten die Zellen dazu mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 ng/ml (Kanda und Watanabe 2008). Die stärkste in ihrem Experiment gemessene hBD-2-Expression fanden sie bei der zweithöchsten Konzentration (10 ng/ml), allerdings unter Kostimulation mit IL-1 β . Das Ergebnis ließ sich also nicht gänzlich auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplanten Experimente übertragen. Daher wurde entschieden, zunächst eine Leptin-Konzentration von 100 ng/ml für die Inkubationsexperimente zu verwenden.

Für die Adipokine Visfatin und Resistin lagen zu Beginn der experimentellen Arbeit keine Studien zur *in vitro*-Wirkung auf Keratinozyten vor. In Zellkultur-Experimenten mit humanen Gefäßmuskelzellen, humanen Endothelzellen und humanen Adipozyten wurden beide Adipokine in Konzentrationen verwendet, die durchschnittlich über dem Serumlevel lagen (u.a. Inkubation von Gefäßmuskelzellen mit 10-250 ng/ml Visfatin, Romacho et al. 2009, Kultivierung von humanen Adipozyten mit 10-50 ng/ml Resistin, Kusminski et al. 2007). Hier fanden sich auch in submaximaler Dosierung Auswirkungen auf die exkretorischen Funktionen der kultivierten Zellen (Romacho et al. 2009). Beide Adipokine wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet.

4.2 AMP-Synthese humaner Keratinozyten nach Inkubation mit Adipokinen

4.2.1 Stimulation mit Adiponektin

Adiponektin ist das bisher am besten untersuchte Adipokin. Diesem Botenstoff, der hauptsächlich von Adipozyten produziert wird, werden vor allem antiinflammatorische und antiatherogene Funktionen zugeschrieben. In Übereinstimmung damit finden sich verminderte Adiponektin-Level bei Adipositas, welche mit chronisch leichtgradiger Entzündung einhergeht (Arita et al. 1999). Neuere Studien zeigen Entsprechendes auch für Psoriasis (Kaur et al. 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Adiponektin auf die Expression der antimikrobiellen Peptide Psoriasin (S100A7), RNase 7, hBD-2 und -3 durch normale humane Keratinozyten (NHEK) untersucht. Hierbei zeigte sich in drei unabhängigen Versuchen bei Inkubation mit 100 ng/ml eine Zunahme der Expression von RNase 7 und hBD-3 nach 48 (im Mittel 2- bzw. 6-

fach) und 72 Stunden (7- bzw. 33-fach) Inkubation, für hBD-2 fand sich lediglich eine schwache Erhöhung nach 72 Stunden (2-fach), die Expression von Psoriasin war im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Ein entsprechendes Expressionsmuster fand sich auch in Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Reaktion, hierbei wurden primäre Keratinozyten mit Adiponektin-Konzentrationen von 50, 100, 500 und 1000 ng/ml inkubiert. Zeit- und dosisabhängig wurde eine Zunahme der Expression von RNase 7 und hBD-3 detektiert, wobei sich bei beiden AMP die stärkste Expressionsänderung bei einer Stimulation mit 500 ng/ml für 48 und 72 Stunden nachweisen ließ.

Vermutlich konnte aufgrund der kleinen Stichprobe und deutlichen Expressionsunterschieden zwischen den verwendeten Zellchargen kein signifikanter Einfluss von Adiponektin auf die Expression der AMP nachgewiesen werden, obwohl in jedem der unabhängigen Versuche ein ähnliches Induktionsmuster gefunden wurde. Die Signifikanz der Ergebnisse der Adiponektin-Dosiskinetik ist nur eingeschränkt zu beurteilen, da es sich jeweils um Mittelwerte aus lediglich zwei unabhängigen Versuchen handelt. Zwar wurde mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben ein für $n \geq 2$ geeigneter Test durchgeführt, bei derart kleinen Stichproben ist die Aussagekraft dennoch begrenzt (McDonald 2009).

Da in allen durchgeführten Versuchen eine analoge Reaktion der Zellen auf die Inkubation mit Adiponektin nachweisbar war, lässt sich trotz der fehlenden statistischen Signifikanz vermuten, dass es sich nicht um zufällige Abweichungen in der Freisetzung der antimikrobiellen Peptide handelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können daher durchaus als ein Hinweis auf einen möglichen Einfluss von Adiponektin auf die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden durch Keratinozyten verstanden werden.

In der Literatur werden bisher keine Untersuchungen zu dem Einfluss von Adiponektin auf die AMP-Expression durch Keratinozyten beschrieben. Eine Beeinflussung der AMP-Produktion durch Adiponektin ist jedoch durchaus denkbar, zumal dieses Adipokin diverse immunmodulatorische Wirkungen hat, die sowohl das angeborene – zu dem die AMP gehören – als auch das erworbene Immunsystem betreffen (Stofkova 2009).

Im Hinblick auf diese Ergebnisse stellt sich die Frage, wie sich eine mögliche Beeinflussung der AMP-Expression durch Adiponektin erklären ließe. Dabei ist zunächst bedeutsam, dass Keratinozyten regelhaft den Adiponektin-Rezeptor R1 (AdipoR1) exprimieren (Takahashi et al. 2010), damit also in der Lage sind auf eine Stimulation mit dem Adipokin zu reagieren. Der Rezeptor findet sich in allen Zelllagen der Epidermis mit einer Betonung der basalen Zellreihen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren allerdings eher eine indirekte Wirkungsweise des Adipokins, da die beobachteten Expressionsveränderungen frühestens nach 48, größtenteils jedoch nach 72 Stunden auftreten. Dieser Zeitpunkt spricht gegen einen direkten Effekt, bei dem

Veränderungen auf mRNA-Ebene im Allgemeinen spätestens nach 16-24 Stunden zu erwarten wären. Es lässt sich also postulieren, dass Adiponektin die Freisetzung eines zweiten Faktors modulieren könnte, der seinerseits die AMP-Expression beeinflusst.

Zu den bisher bekannten Induktoren der AMP-Freisetzung gehören neben Bakterien vor allem proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , INF- γ und verschiedene Interleukine, vor allem IL-1 β , -17 und -22. Da die Zellkulturexperimente unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden, stellen die verschiedenen von Keratinozyten produzierten Zytokine einen plausiblen Erklärungsansatz für eine indirekte Induktion von AMP dar. Dagegen spricht, dass sich das beobachtete Expressionsmuster nicht mit den von Keratinozyten produzierten Zytokinen erklären lässt: so setzen die Zellen beispielsweise TNF- α frei, was zu einer Induktion von Psoriasis und hBD-2 führen müsste; gleichzeitig wird INF- γ nicht von Keratinozyten produziert, wäre aber als einzig bekanntes Zytokin in der Lage, hBD-3 zu induzieren (Shirakata 2010).

Zudem liegen bezüglich des Einflusses von Adiponektin auf Zytokine in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vor, die sowohl inhibierende als auch induzierende Effekte auf deren Freisetzung beschreiben. Als eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wird vermutet, dass die immunmodulatorischen Wirkungen von Adiponektin gewebs- und receptorspezifisch von der vorliegenden Isoform abhängig sein könnten, wobei die zirkulierenden Isoformen unterschiedliche Oligomere des Peptids darstellen (Stofkova 2009). So zeigten Tilg und Moschen einen antiinflammatorischen Einfluss von Adiponektin mit geringem Molekulargewicht auf Monozyten, während die Isoform mit hohem Molekulargewicht die Sekretion des proinflammatorischen IL-6 verstärkte (Tilg und Moschen 2006). Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde das Adiponektin-Monomer verwendet, das sich zu Trimeren und durch Bildung von Disulfidbrücken schließlich zu Oligomeren von 12 bis 18 Einzelpeptiden verbinden kann (Stofkova 2009). Sowohl die Trimere als auch weitere Oligomere des Adipokins finden sich im Blut, während die Monomer-Form vermutlich nur in Adipozyten vorliegt. Inwiefern dies die Ergebnisse der Untersuchungen beeinflusst hat, ist unklar, da keine Daten zu dem Einfluss der verschiedenen Isoformen auf Keratinozyten vorliegen und darüberhinaus nicht bekannt ist, ob die verwendeten Monomere in der Zellkultur oligomerisieren können oder nicht.

Da für die Mehrzahl der genannten Zytokine überwiegend inhibierende Effekte von Adiponektin beschrieben werden und zudem das beobachtete Expressionsmuster nicht durch Zytokine erklärt werden kann, scheint es eher unwahrscheinlich, dass sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer Beeinflussung von AMP-induzierenden Zytokinen durch Adiponektin erklären lassen. Weitere Untersuchungen sollten aufklären, ob diese oder andere Moleküle als Mediatoren der hier beobachteten Induktion identifiziert werden können.

Andere Ergebnisse beschreiben Wachstumsfaktoren als Induktoren einiger AMP. So zeigten Sørensen *et al.* eine vermehrte Freisetzung von hBD-3 als Folge einer Stimulation des „epidermal growth factor“ (EGF)-Rezeptors, was in der Arbeit durch Stimulation von humanen Keratinozyten mit „transforming growth factor“ (TGF)- α und einer Kombination aus TGF- α und „insuline-like growth factor“ (IGF)-1 erreicht wurde (Sørensen *et al.* 2003). Niyonsaba *et al.* wiesen eine Induktion von Psoriasin nach sechsstündiger Inkubation von Keratinozyten mit EGF oder IGF-1 nach (Niyonsaba *et al.* 2008). Für das AMP RNase 7 findet sich bisher keine direkte Erwähnung einer Expressionsregulation durch Wachstumsfaktoren, allerdings wurde nachgewiesen, dass eine IL-1 β -abhängige Induktion der Expression in humanen epithelialen Kornealzellen durch die „transforming growth factor β -activated kinase“ (TAK)-1 vermittelt wird (Mohammed *et al.* 2010). Zu den Aktivatoren dieses Enzyms zählt neben TNF- α und IL-1 β auch der Wachstumsfaktor TGF- β (Yamaguchi *et al.* 1995, Sato *et al.* 2005). Auch für das in dieser Arbeit untersuchte AMP hBD-2 liegen bisher keine Informationen zu einer möglichen Regulation der Expression durch Wachstumsfaktoren vor.

Dass Adiponektin mit diversen Wachstumsfaktoren interagieren kann, wurde in verschiedenen Forschungsarbeiten belegt. Die Ergebnisse sind bezüglich der Richtung der Reaktion widersprüchlich, so beschreiben Wang *et al.* eine vom Oligomerisierungszustand abhängige Bindung von Adiponektin an die Wachstumsfaktoren „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-BB, „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) sowie „Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor“ (HB-EGF) und folgern, dass eine antiproliferative Wirkung des Adipokins unter anderem durch die Modulation der untersuchten Wachstumsfaktoren zu erklären sei (Wang *et al.* 2005). In einer anderen Untersuchung wurde eine Regulation der Expression von TGF- β -Isoformen in Keratinozyten durch Adiponektin beobachtet, dabei wurde TGF- β 1 vermehrt exprimiert, während die Expression der Isoformen TGF- β 2 und 3 vermindert war (Kawai *et al.* 2008). Die Autoren vermuten, dass die durch Adiponektin hervorgerufene Erhöhung von TGF- β 1 möglicherweise an den beschriebenen antiproliferativen Effekten des Adipokins beteiligt sein könnte, da TGF- β einen potenten Inhibitor der Zellproliferation darstellt.

Bekanntermaßen sind vor allem die Wachstumsfaktoren der EGF- und TGF-Familie (u.a. IGF-1, TGF- α , TGF- β 1) sowie bFGF, VEGF und PDGF an der Wundheilung beteiligt, dabei werden die Faktoren TGF- α und - β , bFGF und PDGF auch von Keratinozyten produziert (Barrientos *et al.* 2008, Shirakata 2010). Die bedeutende Rolle, die diesen Botenstoffen bei der Wundheilung zukommt, lässt sich mit einer möglichen Beteiligung an der Regulation der AMP-Freisetzung in Einklang bringen: Die Abwehrmechanismen der Haut sind nach einer Schädigung der physiologischen Barrierefunktion von kritischer Bedeutung für die Protektion gegen die Invasion pathologischer Keime, so dass eine

koordinierte und unmittelbare Hochregulation der antimikrobiellen Peptide sinnvoll scheint. Hierbei wäre es zweckmäßig, die Induktion der lokalen Abwehr ohne Latenz direkt einzuleiten, wozu eine autokrine Stimulation der Keratinozyten durch selbst produzierte Wachstumsfaktoren geeignet scheint.

Diese Annahme wird durch Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe untermauert. So fanden Harder und Kollegen eine Expressionszunahme von hBD-3 *in vivo* nach artifizieller Störung der Hautbarriere durch „tape stripping“ und vermuteten, die Induktion von hBD-3 könnte eine Konsequenz der Induktion von Wachstumsfaktoren nach Verletzung der Haut sein (Harder et al. 2010).

Insgesamt lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren, dass Wachstumsfaktoren den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Anstieg der Expression von RNase 7 und hBD-3 beeinflusst haben könnten. Um definitivere Aussagen treffen zu können, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Ebenso bleibt unklar, ob es sich bei dem beobachteten Effekt von Adiponektin um eine physiologische Wirkung – wie in ähnlicher Form für salivales Leptin im Rahmen der Wundheilung in der Mundhöhle beschrieben – oder vielmehr um ein Epiphänomen der Wirkungen des Adipokins handelt (Gröschl et al. 2005).

Der Wachstumsfaktor EGF wird nicht von Keratinozyten produziert, war jedoch in einer Konzentration von 0,125 ng/ml als rekombinantes Human-EGF in dem verwendeten Kulturmedium enthalten. Hier ließe sich mutmaßen dass die Freisetzung der antimikrobiellen Peptide durch das enthaltene EGF beeinflusst worden sein könnte, zumal für Psoriasis ein solcher Effekt vorbeschrieben ist (Niyonsaba et al. 2008). Niyonsaba und Kollegen verwendeten EGF jedoch in einer über 600-fach höheren Konzentration (80 ng/ml). Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Psoriasis-Expression detektiert, so dass ein Einfluss des im Kulturmedium enthaltenen EGF aufgrund der geringen Konzentration hier kaum wahrscheinlich scheint.

Der hier beobachtete Anstieg der Expression nach frühestens 48 Stunden spricht insgesamt gegen einen direkten Effekt eines in der Kultur enthaltenen Stimulanz. Ob durch ein im Medium enthaltenes Agens eine indirekte Stimulation stattgefunden hat, lässt sich nur spekulieren, da bisher zu keinem der enthaltenen bioaktiven Stoffe entsprechende Informationen vorliegen.

Ein weiterer Faktor, der zu den beobachteten Unterschieden in der AMP-Expression als Reaktion auf die Stimulation mit Adipokinen beigetragen haben könnte, ist der Grad der Differenzierung der Keratinozyten. So wurde in verschiedenen Arbeiten belegt, dass die antimikrobiellen Peptide Psoriasis und hBD-2 ausschließlich von differenzierten Keratinozyten produziert werden (Harder et al. 2004, Martinsson et al. 2005).

Gleichzeitig liegen Hinweise dafür vor, dass Adiponektin die Differenzierung von Keratinozyten inhibiert. Dies konnten Kawai und Kollegen zeigen, sie untersuchten die Expression von Involukrin, einem gängigen Marker der Keratinozyten-Differenzierung, an spontan immortalisierten sogenannten HaCaT-Keratinozyten mithilfe von RT-PCR (Kawai et al. 2008). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für Psoriasin und hBD-2 keine Expressionsveränderung nach Inkubation mit Adiponektin, während RNase 7 und hBD-3 im Vergleich zur Kontrolle induziert werden.

Hier ließe sich mutmaßen, dass die Expression der beiden abhängig vom Differenzierungsgrad exprimierten AMP in den durchgeführten Experimenten deshalb nicht vermehrt war, weil das eingesetzte Stimulanz Adiponektin die Differenzierung der Keratinozyten behinderte, und so das detektierte Expressionsmuster erklärt werden könnte. Dann müssten jedoch Psoriasin und hBD-2 im Vergleich zur normal differenzierten Kontrolle vermindert exprimiert werden, was nicht der Fall war.

Um die aufgestellte Hypothese, es handle sich bei den beobachteten Expressionsveränderungen der antimikrobiellen Peptide um einen indirekten Effekt, weitergehend zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich einige Vorversuche durchgeführt (Daten nicht abgebildet). Dabei wurden Kulturüberstände eines Versuchs, in dem primäre Keratinozyten für 48 Stunden mit Adiponektin oder mit Leptin inkubiert wurden, ohne weitere Zusätze auf 24 Stunden kultivierte Keratinozyten gegeben, diese für weitere 24 Stunden inkubiert und anschließend die mRNA-Expression von RNase 7 und hBD-3 mittels RTq-PCR ermittelt. Hier zeigte sich für alle mit Kulturüberständen inkubierten Ansätze eine deutliche Expressionsvermehrung um ein Drei- bis Neunfaches sowie ebenfalls eine deutliche Vermehrung der mRNA-Expression in den mit Überstand aus der Mediumkontrolle inkubierten Kulturen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es zu einer Beeinflussung der AMP-Freisetzung durch die Zellkulturbedingungen kommt. Die Einzelheiten dieser Einflussnahme müssen in weiteren systematischen Analysen untersucht werden.

In einem weiteren Ansatz wurden die Kulturüberstände der Experimente zur Zeitkinetik mittels ELISA auf den Proteingehalt von RNase 7 und hBD-3 untersucht. Der RNase 7-Gehalt der nach 48 Stunden Inkubation gewonnenen Überstände von Kontrollen und stimulierten Ansätzen lag unterhalb der Nachweisgrenze ($\leq 0,3$ ng/ml). Nach 72 Stunden war in den Kulturüberständen jedoch doppelt soviel Protein wie in den Überständen der Kontrollen nachweisbar. Diese Ergebnisse sind konkordant zu den erhobenen mRNA-Daten, die einen Anstieg der Expression von RNase 7-mRNA frühestens nach 48, hauptsächlich aber nach 72 Stunden Inkubation zeigen, da die Proteinsynthese der mRNA-Expression nachgeschaltet ist.

Der hBD-3-Gehalt der Proben unterschied sich zu keinem Zeitpunkt von dem der Kontrollen, dabei lagen die ermittelten Werte knapp oberhalb der Detektionsgrenze (bei einer Detektionsgrenze von 0,8 ng/ml war durchschnittlich 1,1 ng/ml hBD-3 nachweisbar). Die Ergebnisse der RTq-PCR zeigten hingegen eine starke Expressionszunahme nach 48 und 72 Stunden Inkubation mit Adiponektin. Ähnliche Diskrepanzen zwischen einem eindeutigen Nachweis von hBD-3-mRNA und fehlendem extrazellulären Proteinnachweis sind vorbeschrieben: Harder *et al.* untersuchten die *in vivo*-Expression und -Sekretion verschiedener AMP bei atopischer Dermatitis, Psoriasis und nach Verletzung der Hautbarriere, hierzu wurden Hautbiopsien mittels Immunhistologie und Hautspüllösungen mittels ELISA analysiert (Harder et al. 2010). Die detektierte Proteinmenge von hBD-3 lag trotz starker Expression in den Hautbiopsien in allen untersuchten Spüllösungen unterhalb der Detektionsgrenze. Die Autoren vermuten, dass das stark kationische Molekül hBD-3 an negativ geladene Strukturen der Keratinozyten gebunden und damit schlecht nachweisbar sein könnte. Die ELISA-Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Vermutungen.

4.2.2 Stimulation mit Leptin

Das Adipokin Leptin wird hauptsächlich von Zellen des weißen Fettgewebes produziert, dabei korreliert die Höhe des Serumlevels direkt mit dem Fettgehalt des Körpers und der Größe der Adipozyten (Gerdes et al. 2011). Allgemein wird Leptin vor allem als proinflammatorisches Adipokin beschrieben, dennoch ist der Effekt von Leptin auf die Zytokin-Produktion noch nicht abschließend geklärt (Stofkova 2009).

Eine Beteiligung von Leptin an der Pathogenese der Psoriasis bzw. deren Komorbiditäten wird für möglich gehalten, da verschiedene Studien eine Erhöhung des Leptin-Serumlevels vor allem in schwer beeinträchtigten Psoriasis-Patienten belegen konnten (Takahashi et al. 2008, Wang et al. 2008, Cerman et al. 2008, Chen et al. 2008). Cerman *et al.* konnten darüberhinaus an immunhistochemisch untersuchten Hautproben zeigen, dass bei Psoriasis-Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf die Expression des Leptin-Rezeptors Ob-Rb in Epidermis und Dermis vermehrt ist (Cerman et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Leptin auf die Expression und Sekretion der antimikrobiellen Peptide Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und -3 untersucht. Dabei fand sich eine Zunahme der Expression von RNase 7 nach 48 (2-fach) und 72 Stunden Inkubation (7-fach, $p = 0,06$) mit 100 ng/ml Leptin. Auch die mRNA-Expression von hBD-3 war nach 48- (6-fach) und 72-stündiger (28-fach) Inkubation deutlich induziert. Die Expression der AMP Psoriasin und hBD-2 war gegenüber der Kontrolle unverändert. Ähnlich zu den mit Adiponektin stimulierten Kulturen konnte jedoch auch für

Leptin kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Expression der genannten AMP nachgewiesen werden. Aufgrund des in allen Versuchen detektierbaren ähnlichen Expressionsmuster scheint es aber auch hier durchaus angebracht, von einer Beeinflussung der AMP-Expression durch Leptin auszugehen.

Analog zu den bereits diskutierten Ergebnissen zur Stimulation mit Adiponektin ist auch bei der Inkubation mit Leptin aufgrund des Zeitprofils davon auszugehen, dass es sich um eine indirekte Wirkweise handelt. Auch hier kämen als Mediatoren der Reaktion zum Einen Zytokine in Frage, die durch Leptin induziert werden können und darüberhinaus als Induktoren einiger AMP bekannt sind. Es gibt jedoch bisher nur wenige Informationen bezüglich einer Beeinflussung der Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten durch Leptin. Lediglich Takahashi und Kollegen untersuchten diesen Zusammenhang und wiesen eine durch Leptin hervorgerufene Zunahme der TNF- α - und IL-6-Sekretion durch humane Keratinozyten nach, nachdem diese mit UV-B-Strahlung behandelt worden waren, um die Freisetzung der beiden Zytokine zu induzieren (Takahashi et al. 2010).

Ähnlich wie für Adiponektin gilt aber auch hier, dass bisher kein von Keratinozyten produziertes Zytokin bekannt ist, das durch Leptin induziert wird und gleichzeitig in der Lage ist, die Expression von RNase 7 und hBD-3 zu verstärken, ohne die Freisetzung von Psoriasin und hBD-2 zu beeinflussen. Daher scheint eine Vermittlung der Induktion durch o.g. Zytokine eher unwahrscheinlich. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese oder andere Moleküle als Mediatoren der beobachteten Induktion zu identifizieren.

Analog zu Adiponektin ist auch für die Ergebnisse der Stimulation mit Leptin eine Vermittlung der Reaktion durch Wachstumsfaktoren denkbar, da auch für Leptin ein induzierender Effekt auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch verschiedenste Zellarten beschrieben wurde (Frankenberry et al. 2004, Shin et al. 2008). Gröschl und Kollegen untersuchten den Einfluss von Leptin auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch Keratinozyten. Dazu wurden humane orale nicht-gingivale Keratinozyten mit rekombinantem und aus humanem Speichel gewonnenem Leptin (zwischen 0,1 und 100 ng/ml) inkubiert. Eine zeit- und dosisabhängige Induktion von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) und EGF konnte auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Gröschl et al. 2005). Für orale Keratinozyten ist die Synthese von KGF und EGF belegt, für nicht-orale Keratinozyten liegen derartige Informationen jedoch nicht vor (Formanek et al. 1999, Gröschl et al. 2005). Hier wird allgemein angenommen, dass die Zellen nicht in der Lage sind KGF oder EGF zu produzieren (Shirakata 2010). Daher ist fraglich, inwiefern sich die Ergebnisse von Gröschl und Kollegen auf nicht-orale Keratinozyten übertragen lassen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Forschungsgruppe finden sich jedoch auch für nicht-orale Keratinozyten verschiedene

Arbeiten, die eine Beteiligung von Leptin an der Regulation der Zellproliferation bzw. der Wundheilung zeigen konnten (Murad et al. 2003, Takahashi et al. 2010). Ähnlich wie bereits für Adiponektin angeführt, scheint eine Regulation der AMP-Produktion durch Wachstumsfaktoren, die an den Vorgängen der Wundheilung beteiligt sind, als Erklärung für die hier vorliegenden Ergebnisse denkbar, zumal für die AMP Psoriasin, RNase 7 und hBD-3 Hinweise auf eine Regulation durch Wachstumsfaktoren vorliegen (Niyonsaba et al. 2008, Sörensen et al. 2003, Mohammed et al. 2010). Weiterführende Untersuchungen sind auch hier notwendig.

Kanda und Watanabe untersuchten bisher als Einzige den Einfluss von Leptin auf die Freisetzung eines antimikrobiellen Peptids – hBD-2 – durch Keratinozyten, wobei eine Stimulation mit Leptin keine Effekte zeigte (Kanda und Watanabe 2008). Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. In weiterführenden Untersuchungen fanden die Forscher eine Verstärkung der mit IL-1 β induzierten hBD-2-Expression und Sekretion durch Leptin nach Inkubation von primären Keratinozyten mit IL-1 β (1 ng/ml) und/oder Leptin (0,1 bis 100 ng/ml) für 48 Stunden. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass Leptin die kutane antimikrobielle Abwehr und Entzündung sowie die kutane Wundheilung unterstützen könne. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Vorversuche zum Einfluss einer Ko-Stimulation mit IFN- γ und IL-17 auf die durch Adipokine induzierte AMP-Freisetzung durch Keratinozyten durchgeführt (Daten nicht abgebildet). Hierbei wurden primäre Keratinozyten für 48 und 72 Stunden mit Leptin oder mit Adiponektin inkubiert und jeweils 20 Stunden vor Ende der Inkubation 20 ng/ml IFN- γ und IL-17 hinzugefügt. Anschließend wurde mittels RTq-PCR die mRNA-Expression der beiden antimikrobiellen Peptide RNase 7 und hBD-3 untersucht. Die mRNA-Expression der mit Leptin stimulierten Ansätze unterschied sich nicht von der Kontrolle, die ebenfalls mit IFN- γ und IL-17 behandelt wurde. Die mit Adiponektin inkubierten Ansätze wiesen im Vergleich zur Kontrolle jedoch eine Zunahme der Expression von RNase 7 (2,5-fach) und hBD-3 (3,5-fach) auf. Insgesamt fand sich eine deutlich verstärkte mRNA-Expression im Vergleich zu den Experimenten ohne Ko-Stimulation. Um diese Regulation der AMP-Induktion weiter im Detail nachzuweisen, sollten weiterführende Ko-Stimulations-Experimente durchgeführt werden. Warum die gleichzeitige Inkubation mit Leptin in diesem Vorversuch nicht zu einer Expressionszunahme führte, lässt sich nur vermuten. Denkbar wäre, dass der Einfluss von Leptin auf die Freisetzung der AMP deutlich geringer ausgeprägt ist als es die Ergebnisse der Zeitkinetik-Versuche vermuten lassen und dieser Effekt hier durch die Stimulation mit den beiden Zytokinen überlagert wird.

Die Analyse der Proteinsekretion der beiden AMP RNase 7 und hBD-3, die mittels ELISA in den Kulturüberständen der mit Leptin stimulierten Keratinozyten untersucht wurde, zeigte ein Sekretionsmuster das dem nach Stimulation mit Adiponektin entsprach: die RNase 7-Werte nach 48 Stunden lagen unterhalb der Nachweisgrenze, während die 72-Stunden-Werte eine 2-fache Induktion zeigten (1,59 versus 0,71 ng/ml). Die Proteinmenge von hBD-3 lag knapp oberhalb der Nachweisgrenze und unterschied sich weder nach 48 noch nach 72 Stunden Inkubation von der Kontrolle. Analog zu der Stimulation mit Adiponektin lässt sich vermuten, dass nur wenig hBD-3 von den Keratinozyten sezerniert wird und zudem die starke positive Ladung des Moleküls zu einer Bindung an anionische Strukturen der Zellen führt, so dass das Protein mit wässrigen Flüssigkeiten nur schwer auswaschbar ist (Harder et al. 2010).

4.2.3 Stimulation mit Resistin und Visfatin

Für beide Adipokine konnte in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation mit 100 ng/ml kein Einfluss auf die Expression der AMP Psoriasis, RNase 7, hBD-2 und -3 durch Keratinozyten nachgewiesen werden, auch in der aktuellen Literatur findet sich kein Hinweis auf einen derartigen Effekt.

Über die Funktionen der beiden Adipokine ist bisher nur wenig bekannt, beide werden als proinflammatorisch beschrieben und treten bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der Psoriasis in erhöhten Plasmakonzentrationen auf (Bokarewa et al. 2005, Moschen et al. 2007, Gerdes et al. 2011). Auch die Experimente der vorliegenden Arbeit konnten leider nicht zur weiteren Aufklärung der Funktionen dieser Adipokine beitragen.

4.2.4 Hohe Variabilität der Expressionshöhe zwischen den verwendeten Zellchargen

Bei der Auswertung der durchgeführten Experimente fiel auf, dass die verschiedenen Zellchargen offensichtlich unterschiedliche Potentiale zur Produktion der AMP besaßen, so unterschieden sich alle Inkubationsansätze einschließlich der Kontrollen der einzelnen Versuche bezüglich des durchschnittlichen Expressionsniveaus: die relative Expression der AMP in den stimulierten Ansätzen streute dabei im Mittel um ein 20-faches und maximal um den Faktor 90, in den Kontrollen fand sich sogar ein Unterschied von bis zu zwei Zehnerpotenzen. Bezüglich der Proteinsekretion unterschieden sich die einzelnen Chargen weniger stark, die Ergebnisse streuten hier lediglich um den Faktor 4.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen unserer und anderer Arbeitsgruppen, in denen sich ebenfalls eindeutige interindividuelle Expressionsunterschiede finden:

Gläser und Kollegen untersuchten den Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Produktion von antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten, dabei fanden sie sowohl *in vitro* als auch in Waschlösungen und Stanzbiopsien von Probanden deutliche interindividuelle Unterschiede bezüglich

der mRNA- und Proteinexpression der untersuchten AMP (Psoriasin, RNase7, hBD-2 und -3) und auch die Reagibilität auf die vorgenommene Bestrahlung war interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägt (Gläser et al. 2009).

Große Unterschiede in der Höhe der relativen mRNA-Expression finden sich auch bei Gambichler und Kollegen. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die differentielle mRNA-Expression der AMP Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und -3 bei atopischer Dermatitis im Vergleich zu Psoriasis vulgaris und gesunder Haut (Gambichler et al. 2008). In die *in vivo*-Studie waren 18 Kontrollen eingeschlossen, bei denen mittels RT-PCR die relative Expression der AMP in Hautbiospien ermittelt wurde. Diese zeigte individuelle Unterschiede um bis zu zwei Zehnerpotenzen. Ähnliche Ergebnisse finden sich in weiteren Arbeiten dieser Forschergruppe (Gambichler et al. 2006, Gambichler et al. 2009).

Auch in einer aktuellen Arbeit von Harder *et al.* findet sich bei Analyse der Ergebnisse eine große Variabilität der freigesetzten AMP-Konzentration (Harder et al. 2010). Hier wurden 34 gesunde Individuen als Kontrollen herangezogen und Waschlösungen von definierten Körperstellen mittels ELISA auf die sezernierte Menge von Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und -3 untersucht, die detektierten Konzentrationen streuten hierbei um den Faktor 20.

Die genannten Beispiele belegen deutlich, dass es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ausgeprägte interindividuelle Unterschiede bezüglich der Expression und Sekretion der AMP gibt. Daher scheint es dringend notwendig, in weiterführenden Experimenten eine entsprechend große Stichprobe einzuschließen oder ein Gemisch von Keratinozyten verschiedener Spender zu verwenden.

4.2.5 Abschließende Beurteilung

Im Bezug auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lässt sich zusammenfassen, dass kein direkter Einfluss der Adipokine auf die Freisetzung der untersuchten AMP nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Induktion der mRNA-Expression von RNase 7 und hBD-3 in humanen Keratinozyten erst nach 48- und 72-stündiger Stimulation mit Adiponektin oder Leptin nachgewiesen werden konnte. Dabei gelang es trotz des einheitlichen Expressionsmusters in den meisten Ansätzen nicht, statistische Signifikanz zu erreichen, vermutlich aufgrund der hohen Expressionsunterschiede der einzelnen Zellchargen und einer zu geringen Stichprobengröße.

Angesichts des späten Zeitpunkts der detektierten Expressionsveränderung lässt sich ein – möglicherweise durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine vermittelter – indirekter Effekt der Adipokine auf die Keratinozyten vermuten. Auch ein Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die AMP-Expression wäre denkbar, wie ein Vorversuch mit Zellkulturüberständen impliziert.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die hier gewonnenen Ergebnisse genauer einzuordnen.

5. Zusammenfassung

In der Haut von Psoriasis-Patienten wurde eine erhöhte Expression und Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) nachgewiesen. AMP werden in verschiedenen Epithelien konstitutiv oder induzierbar exprimiert und spielen eine große Rolle in der Abwehr von Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze. Weiterhin werden diesen Molekülen auch immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben. Aktuelle Untersuchungen zeigen ferner ein verändertes Profil von Adipokinen im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten. Adipokine sind von Adipozyten produzierte Mediatoren mit vielfältigen metabolischen Wirkungen, außerdem beeinflussen auch sie immunologische Vorgänge. Kürzlich konnten erhöhte Serumspiegel von Leptin und Resistin und verminderte Konzentrationen von Adiponektin bei Psoriasis-Patienten nachgewiesen werden, darüberhinaus wurde eine erhöhte Expression von Visfatin in Hautbiopsien gezeigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Adipokine einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von AMP durch Keratinozyten aufweisen. Hintergrund für diese Untersuchungen ist die bis zum jetzigen Zeitpunkt nur unvollständig verstandene Pathogenese der Psoriasis, in die genetische und immunologische Vorgänge involviert sind. Inwiefern die erhöhten AMP und Adipokine an den Krankheitsmechanismen beteiligt sind, ist noch unklar.

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden Zellkulturen primärer Keratinozyten für 24, 48 und 72 Stunden mit den Adipokinen Adiponektin, Leptin, Resistin und Visfatin inkubiert, als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellkulturen. Anschließend wurde mittels quantitativer real-time PCR (RTq-PCR) die relative mRNA-Expression der AMP Psoriasin (S100A7), RNase 7, humanes β -Defensin (hBD)-2 und -3 analysiert. Dabei zeigte sich in drei unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen Keratinozyten-Chargen eine Induktion der mRNA-Expression von RNase 7 und hBD-3 nach Stimulation der Zellen mit Adiponektin und Leptin nach 48 und 72 Stunden.

Zur ergänzenden Untersuchung der Protein-Sekretion wurden die Überstände der mit Adiponektin und Leptin stimulierten Zellkulturen mittels enzymgekoppeltem Immunoabsorptionstest (ELISA) auf die Freisetzung von RNase 7 und hBD-3 untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCR zeigte sich eine verstärkte Sekretion von RNase 7 nach Inkubation mit Adiponektin und Leptin für 72 Stunden. Eine erhöhte Konzentration von hBD-3 ließ sich hingegen nicht nachweisen.

Um die Dosisabhängigkeit des beobachteten Effekts im Detail zu untersuchen, wurden weiterhin Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Adiponektin (50, 100, 500 und 1000 ng/ml) stimuliert und in zwei unabhängigen Versuchen über 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die relative mRNA-Expression von Psoriasin (S100A7), RNase 7, hBD-2 und -3 mittels RTq-PCR analysiert. Im Rahmen dieser Versuche wurde eine dosisabhängige Zunahme der Expression von

RNase 7 und hBD-3 detektiert, wobei die Stimulation mit 500 ng/ml für 48 und 72 Stunden bei beiden AMP die stärkste Expressionssteigerung hervorrief.

Obwohl in allen Experimenten ein analoges Muster einer Induktion gezeigt werden konnte, wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Ursächlich hierfür könnten eine nicht ausreichend große Stichprobe sowie die deutlichen Unterschiede des Expressionsniveaus der verwendeten Zellchargen sein. Dieses Phänomen findet sich auch in Arbeiten anderer Autoren.

Insgesamt spricht der späte Zeitpunkt der Induktion eher für einen indirekten Einfluss der Adipokine auf die Expression der AMP in Keratinozyten. Als Mediatoren des beobachteten Effekts könnten beispielsweise Zytokine oder Wachstumsfaktoren in Frage kommen, auch könnten die Kulturbedingungen bei der Induktion der AMP eine Rolle spielen.

Abschließend ist festzustellen, dass weitere systematische Untersuchungen notwendig sind, um die Bedeutung der Adipokine im Zusammenhang mit der Expression von antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten weiter zu analysieren.

Literaturverzeichnis

- Adamczak, M., Wiecek, A., Funahashi, T., Chudek, J., Kokot, F. & Matsuzawa, Y. (2003): Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*, 16, 72-5
- Applied Biosystems, T. (2010): Guidelines to Performing Relative Quantification. 158 - 62. Applied Biosystems Online Tutorium
- Arikawa, E., Sun, Y., Wang, J., Zhou, Q., Ning, B., Dial, S. L., Guo, L. & Yang, J. (2008): Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics*, 9, 328
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. & Matsuzawa, Y. (1999): Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257, 79-83
- Augustin, M., Reich, K., Glaeske, G., Schaefer, I. & Radtke, M. (2010): Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany. *Acta Derm Venereol*, 90, 147-51
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M., Brem, H. & Tomic-Canic, M. (2008): Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16, 585-601
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U. & Tarkowski, A. (2005): Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*, 174, 5789-95
- Bowcock, A. M. & Krueger, J. G. (2005): Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol*, 5, 699-711
- Brogden, K. A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3, 238-50
- Cerman, A. A., Bozkurt, S., Sav, A., Tulunay, A., Elbasi, M. O. & Ergun, T. (2008): Serum leptin levels, skin leptin and leptin receptor expression in psoriasis. *Br J Dermatol*, 159, 820-6
- Chang, Y. C., Chang, T. J., Lee, W. J. & Chuang, L. M. (2010): The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism*, 59, 93-9
- Chen, B. H., Song, Y., Ding, E. L., Roberts, C. K., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., Gaziano, J. M. & Liu, S. (2009): Circulating levels of resistin and risk of type 2 diabetes in men and women: results from two prospective cohorts. *Diabetes Care*, 32, 329-34
- Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Hara, M., Yokoi, H., Matsumoto, K., Saito, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K. & Ogawa, H. (2007): Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol*, 37, 434-44
- Chen, Y. J., Wu, C. Y., Shen, J. L., Chu, S. Y., Chen, C. K., Chang, Y. T. & Chen, C. M. (2008): Psoriasis independently associated with hyperleptinemia contributing to metabolic syndrome. *Arch Dermatol*, 144, 1571-5
- Christophers, E. (2007): Comorbidities in psoriasis. *Clin Dermatol*, 25, 529-34
- Civitaresse, A., Ukropcova, B., Carling, S., Hulver, M., DeFronzo, R., Mandarino, L., Ravussin, E. & Smith, S. (2006): Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. *Cell Metab*, 4, 75-87
- Cnop, M., Havel, P. J., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Sinha, M. K., Boyko, E. J., Retzlaff, B. M., Knopp, R. H., Brunzell, J. D. & Kahn, S. E. (2003): Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 46, 459-69

-
- Cohen, A. D., Sherf, M., Vidavsky, L., Vardy, D. A., Shapiro, J. & Meyerovitch, J. (2008): Association between psoriasis and the metabolic syndrome. A cross-sectional study. *Dermatology*, 216, 152-5
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L. & et al. (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334, 292-5
- de Jongh, G. J., Zeeuwen, P. L., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P. G., Blokk, W., Dogan, A., Hiemstra, P. S., van de Kerkhof, P. C. & Schalkwijk, J. (2005): High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 125, 1163-73
- Deng, Y. & Scherer, P. E. (2010): Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1212, E1-E19
- Desruisseaux, M. S., Nagajyothi, Trujillo, M. E., Tanowitz, H. B. & Scherer, P. E. (2007): Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infect Immun*, 75, 1066-78
- Dubertret, L., Mrowietz, U., Ranki, A., van de Kerkhof, P. C., 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
- Fantuzzi, G. (2005): Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 115, 911-9; quiz 20
- Filkova, M., Haluzik, M., Gay, S. & Senolt, L. (2009): The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*, 133, 157-70
- Formanek, M., Knerer, B. & Kornfehl, J. (1999): Cytokine expression of human oral keratinocytes. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 61, 103-7
- Frank, S., Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N. & Pfeilschifter, J. (2000): Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest*, 106, 501-9
- Frankenberry, K. A., Somasundar, P., McFadden, D. W. & Vona-Davis, L. C. (2004): Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. *Am J Surg*, 188, 560-5
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y. & Shimomura, I. (2005): Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307, 426-30
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tigges, C., Kobus, S., Glaser, R. & Kreuter, A. (2009): Significant upregulation of antimicrobial peptides and proteins in lichen sclerosus. *Br J Dermatol*, 161, 1136-42
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Altmeyer, P. & Kreuter, A. (2006): Changes of antimicrobial peptide mRNA expression in atopic eczema following phototherapy. *Br J Dermatol*, 155, 1275-8
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Othlinghaus, N., Brockmeyer, N. H., Altmeyer, P. & Kreuter, A. (2008): Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol*, 147, 17-24
- Garcia, J. R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodriguez-Jimenez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Kluver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W. G. & Bals, R. (2001): Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 306, 257-64
-

- Gelfand, J. M., Neimann, A. L., Shin, D. B., Wang, X., Margolis, D. J. & Troxel, A. B. (2006): Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *Jama*, 296, 1735-41
- Gerdes, S. & Mrowietz, U. (2009): Impact of comorbidities on the management of psoriasis. *Curr Probl Dermatol*, 38, 21-36
- Gerdes, S., Rostami-Yazdi, M. & Mrowietz, U. (2011): Adipokines and psoriasis. *Exp Dermatol*, 20, 81-7
- Gey, M. H. (2008): *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer: Berlin
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J. M. (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol*, 6, 57-64
- Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J. M. & Schwarz, T. (2009a): The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 129, 641-9
- Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J. M., Schwarz, A. & Schwarz, T. (2009b): UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1117-23
- Goren, I., Pfeilschifter, J. & Frank, S. (2003): Determination of leptin signaling pathways in human and murine keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, 1080-5
- Gröschl, M., Topf, H. G., Kratzsch, J., Dotsch, J., Rascher, W. & Rauh, M. (2005): Salivary leptin induces increased expression of growth factors in oral keratinocytes. *J Mol Endocrinol*, 34, 353-66
- Gruen, M. L., Hao, M., Piston, D. W. & Hasty, A. H. (2007): Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293, C1481-8
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J. M. (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J. M. (2001): Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276, 5707-13
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J. M., Schwarz, T. & Gläser, R. (2010): Enhanced Expression and Secretion of Antimicrobial Peptides in Atopic Dermatitis and after Superficial Skin Injury. *J Invest Dermatol*, 130, 1355-64
- Harder, J., Gläser, R. & Schröder, J. M. (2007): Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res*, 13, 317-38
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L. & Schröder, J. M. (2004): Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol*, 123, 522-9
- Harder, J. & Schröder, J. M. (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 277, 46779-84
- Hazrati, E., Galen, B., Lu, W., Wang, W., Ouyang, Y., Keller, M. J., Lehrer, R. I. & Herold, B. C. (2006): Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol*, 177, 8658-66
- Henseler, T. & Christophers, E. (1985): Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13, 450-6
- Henseler, T. & Christophers, E. (1995): Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 32, 982-6
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10, 413-7

-
- Hoebeeck, J., Speleman, F. & Vandesompele, J. (2007): Real-time quantitative PCR as an alternative to Southern blot or fluorescence in situ hybridization for detection of gene copy number changes. *Methods Mol Biol*, 353, 205-26
- Ingelsson, E., Larson, M. G., Fox, C. S., Yin, X., Wang, T. J., Lipinska, I., Pou, K. M., Hoffmann, U., Benjamin, E. J., Keaney, J. F., Jr. & Vasan, R. S. (2007): Clinical correlates of circulating visfatin levels in a community-based sample. *Diabetes Care*, 30, 1278-80
- Iwashima, Y., Katsuya, T., Ishikawa, K., Ouchi, N., Ohishi, M., Sugimoto, K., Fu, Y., Motone, M., Yamamoto, K., Matsuo, A., Ohashi, K., Kihara, S., Funahashi, T., Rakugi, H., Matsuzawa, Y. & Ogihara, T. (2004): Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*, 43, 1318-23
- Jia, S. H., Li, Y., Parodo, J., Kapus, A., Fan, L., Rotstein, O. D. & Marshall, J. C. (2004): Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest*, 113, 1318-27
- Jiralerspong, S. & Patel, P. I. (1996): Regulation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene: in vitro and in vivo approaches. *Proc Soc Exp Biol Med*, 212, 116-27
- Johnston, A., Arnadottir, S., Gudjonsson, J. E., Aphale, A., Sigmarsdottir, A. A., Gunnarsson, S. I., Steinsson, J. T., Elder, J. T. & Valdimarsson, H. (2008): Obesity in psoriasis: Leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. *Br J Dermatol*, 159, 342-50
- Jung, R., Soondrum, K. & Neumaier, M. (2000): Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*, 38, 833-6
- Kanda, N. & Watanabe, S. (2008): Leptin Enhances Human Beta-Defensin-2 Production in Human Keratinocytes. *Endocrinology*, 149, 5189-98
- Kaur, S., Zilmer, K., Kairane, C., Kals, M. & Zilmer, M. (2008): Clear differences in adiponectin level and glutathione redox status revealed in obese and normal-weight patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 195, 1364-67
- Kawai, K., Kageyama, A., Tsumano, T., Nishimoto, S., Fukuda, K., Yokoyama, S., Oguma, T., Fujita, K., Yoshimoto, S., Yanai, A. & Kakibuchi, M. (2008): Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes—Implication of impaired wound healing in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374, 269-73
- Koczan, D., Guthke, R., Thiesen, H. J., Ibrahim, S. M., Kundt, G., Krentz, H., Gross, G. & Kunz, M. (2005): Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear leukocytes from psoriasis patients identifies new immune regulatory molecules. *Eur J Dermatol*, 15, 251-7
- Konrad, A., Lehrke, M., Schachinger, V., Seibold, F., Stark, R., Ochsenkuhn, T., Parhofer, K. G., Goke, B. & Broedl, U. C. (2007): Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19, 1070-4
- Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J. M. & Harder, J. (2009): RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS One*, 4, e6424
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125
- Kusminski, C. M., da Silva, N. F., Creely, S. J., Fisher, F. M., Harte, A. L., Baker, A. R., Kumar, S. & McTernan, P. G. (2007): The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 270-6
- Lindegård, B. (1986): Diseases associated with psoriasis in a general population of 159,200 middle-aged, urban, native Swedes. *Dermatologica*, 172, 298-304
- Liu, Y., Krueger, J. G. & Bowcock, A. M. (2007): Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes Immun*, 8, 1-12
- Lowes, M. A., Bowcock, Anne M., Krueger James G. (2007): Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445, 866-73
- Luk, T., Malam, Z. & Marshall, J. C. (2008): Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol*, 83, 804-16
-

-
- Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A. H., Basse, B. & et al. (1991): Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, 97, 701-12
- Martinsson, H., Yhr, M. & Enerbäck, C. (2005): Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol*, 14, 161-8
- McDonald, J. H. (2009): *Handbook of Biological Statistics*. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland
- Mohammed, I., Yeung, A., Abedin, A., Hopkinson, A. & Dua, H. S. (2010): Signalling pathways involved in ribonuclease-7 expression. *Cell Mol Life Sci*, 68, 1941-52
- Moschen, A. R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H. & Tilg, H. (2007): Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol*, 178, 1748-58
- Mrowietz, U., Elder, J. T. & Barker, J. (2006): The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*, 298, 309-19
- Mrowietz, U. & Reich, K. (2009): Psoriasis--new insights into pathogenesis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 106, 11-8, quiz 19
- Murad, A., Nath, A. K., Cha, S. T., Demir, E., Flores-Riveros, J. & Sierra-Honigmann, M. R. (2003): Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J*, 17, 1895-7
- Niyonsaba, F., Hattori, F., Maeyama, K., Ogawa, H. & Okamoto, K. (2008): Induction of a microbicidal protein psoriasin (S100A7), and its stimulatory effects on normal human keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 52, 216-9
- Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Matsuda, H., Ogawa, H. & Nagaoka, I. (2002): Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol*, 14, 421-6
- Niyonsaba, F., Ogawa, H. & Nagaoka, I. (2004): Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology*, 111, 273-81
- Okamoto, Y., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Libby, P. (2006): Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*, 110, 267-78
- Ottonello, L., Gnerre, P., Bertolotto, M., Mancini, M., Dapino, P., Russo, R., Garibotto, G., Barreca, T. & Dallegri, F. (2004): Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2366-72
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. (2011): Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 85-97
- Quinones-Mateu, M. E., Lederman, M. M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H. R., Marotta, M. L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P., Medvik, K., Sieg, S. F. & Weinberg, A. (2003): Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS*, 17, F39-48
- Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K. G. & Broedl, U. C. (2008): Adipokines and Insulin Resistance. *Mol Med*, 14, 741-51
- Rapp, S. R., Feldman, S. R., Exum, M. L., Fleischer, A. B., Jr. & Reboussin, D. M. (1999): Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 41, 401-7
- Reilly, M. P., Lehrke, M., Wolfe, M. L., Rohatgi, A., Lazar, M. A. & Rader, D. J. (2005): Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation*, 111, 932-9
- Ribaudo, R., Gilman, M., Kingston, R. E., Choczynski, P. & Sacchi, N. (2001): Preparation of RNA from tissues and cells. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 10, Unit 10 11
- Romacho, T., Azcutia, V., Vázquez-Bella, M., Matesanz, N., Cercas, E., Nevado, J., Carraro, R., Rodríguez-Mañás, L., Sánchez-Ferrer, C. & Peiró, C. (2009): Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia*, 52, 2455-63
-

-
- Rongvaux, A., Shea, R. J., Mulks, M. H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O. & Andris, F. (2002): Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*, 32, 3225-34
- Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S. & McNiece, I. (1994): Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*, 14, 1431-7
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005): Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.*, 6, 1087-95
- Schröder, J. M. & Harder, J. (1999): Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 645-51
- Schröder, J. M., Reich, K., Kabashima, K., Liu, F. T., Romani, N., Metz, M., Kerstan, A., Lee, P. H., Loser, K., Schon, M. P., Maurer, M., Stoitzner, P., Beissert, S., Tokura, Y. & Gallo, R. L. (2006): Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances - lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes? *Exp Dermatol*, 15, 913-29
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-71
- Senolt, L., Housa, D., Vernerova, Z., Jirasek, T., Svobodova, R., Veigl, D., Anderlova, K., Muller-Ladner, U., Pavelka, K. & Haluzik, M. (2007): Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis*, 66, 458-63
- Shakery, K., Mrowietz, U. & Reich, K. (2009): Psoriasis und das metabolische Syndrom. *Der Deutsche Dermatologe*, 307-11
- Shetty, G. K., Economides, P. A., Horton, E. S., Mantzoros, C. S. & Veves, A. (2004): Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2450-7
- Shin, J. H., Kim, J. H., Lee, W. Y. & Shim, J. Y. (2008): The expression of adiponectin receptors and the effects of adiponectin and leptin on airway smooth muscle cells. *Yonsei Med J*, 49, 804-10
- Shirakata, Y. (2010): Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J Dermatol Sci*, 59, 73-80
- Sörensen, O., Cowland, J., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T. & Borregaard, N. (2003): Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol.*, 170, 5583-9.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. & Lazar, M. A. (2001): The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409, 307-12
- Stofkova, A. (2009): Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul*, 43, 157-68
- Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C., Knight, J., Weale, M. E., Allen, M. H., Barton, A., Band, G., Bellenguez, C., Bergboer, J. G., Blackwell, J. M., Bramon, E., Bumpstead, S. J., Casas, J. P., Cork, M. J., Corvin, A., Deloukas, P., Dilthey, A., Duncanson, A., Edkins, S., Estivill, X., Fitzgerald, O., Freeman, C., Giardina, E., Gray, E., Hofer, A., Huffmeier, U., Hunt, S. E., Irvine, A. D., Jankowski, J., Kirby, B., Langford, C., Lascorz, J., Leman, J., Leslie, S., Mallbris, L., Markus, H. S., Mathew, C. G., McLean, W. H., McManus, R., Mossner, R., Moutsianas, L., Naluai, A. T., Nestle, F. O., Novelli, G., Onoufriadis, A., Palmer, C. N., Perricone, C., Pirinen, M., Plomin, R., Potter, S. C., Pujol, R. M., Rautanen, A., Riveira-Munoz, E., Ryan, A. W., Salmhofer, W., Samuelsson, L., Sawcer, S. J., Schalkwijk, J., Smith, C. H., Stahle, M., Su, Z., Tazi-Ahnini, R., Traupe, H., Viswanathan, A. C., Warren, R. B., Weger, W., Wolk, K., Wood, N., Worthington, J., Young, H. S., Zeeuwen, P. L., Hayday, A., Burden, A. D., Griffiths, C. E., Kere, J., Reis, A., McVean, G., Evans, D. M., Brown, M. A., Barker, J. N., Peltonen, L., Donnelly, P. &
-

- Trembath, R. C. (2010): A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet*, 42, 985-90
- Takahashi, H., Honma, M., Ishida-Yamamoto, A. & Iizuka, H. (2010): Adiponectin and leptin modulate cell proliferation and cytokine secretion of normal human keratinocytes and T lymphocytes. *J Dermatol Sci*, 59, 143-5
- Takahashi, H., Tsuji, H., Takahashi, I., Hashimoto, Y., Ishida-Yamamoto, A. & Iizuka, H. (2008): Plasma adiponectin and leptin levels in Japanese patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 159, 1207-8
- Tilg, H. & Moschen, A. (2006): Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, 772-83
- Tilg, H. & Moschen, A. R. (2008): Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond)*, 114, 275-88
- Varoga, D., Pufe, T., Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Mentlein, R., Schroder, J. M., Petersen, W. J., Tillmann, B. N., Proksch, E., Goldring, M. B. & Paulsen, F. P. (2004): Production of endogenous antibiotics in articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50, 3526-34
- Wang, Y., Chen, J., Zhao, Y., Geng, L., Song, F. & Chen, H. D. (2008): Psoriasis is associated with increased levels of serum leptin. *Br J Dermatol*, 158, 1134-5
- Wang, Y., Lam, K. S., Xu, J. Y., Lu, G., Xu, L. Y., Cooper, G. J. & Xu, A. (2005): Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem*, 280, 18341-7
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I. & Williams, P. M. (1999): Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*, 270, 41-9
- Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B. & Tilg, H. (2004): Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 323, 630-5
- Wolff, K., Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S. & Leffell, D. J. (2007): *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*. McGraw-Hill
- Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulegue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., Lubkowski, J. & Lu, W. (2003): Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8880-5
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. & Matsumoto, K. (1995): Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, 270, 2008-11
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. & Oppenheim, J. J. (1999): Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286, 525-8
- Zhou, X., Krueger, J. G., Kao, M. C., Lee, E., Du, F., Menter, A., Wong, W. H. & Bowcock, A. M. (2003): Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics*, 13, 69-78

Danksagung

Zu allererst und ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Regine Gläser für die ausgezeichnete Betreuung, die Hilfsbereitschaft und die Geduld, die sie mir, trotz ihrer Belastung in Klinik und Forschung, entgegengebracht hat. Ohne ihr Interesse und ihre konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten, ebenso für Anregungen und konzeptionelle Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Rostami danke ich für die hervorragende Betreuung. Jederzeit bekam ich hilfreiche Tipps, Anleitung und konstruktive Kritik.

Für die engagierte Einarbeitung in Zellkultur und Laborarbeit danke ich Christa Gronau.

Besonderer Dank geht an Ramona Jurgeleit, die nicht nur bei Zellkultur und PCR half, sondern auch Ansprechpartner für Probleme aller Art war. Ganz herzlich danken möchte ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Kutane Entzündungsreaktionen“ für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Außerdem danke ich allen MTAs der Arbeitsgruppe „Autoimmundermatologie und Antimikrobielle Peptide (AMP) der Haut“ für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der ELISAs, insbesondere Christel Martensen-Kerl.

Meinen Freunden und befreundeten Kommilitonen danke ich für die Motivation, die moralische Unterstützung und die Weitergabe von Erfahrungen. Ganz besonders danke ich Judith für die hilfreichen Ratschläge und das Korrekturlesen der Arbeit und meinem Bruder Marcel für die Unterstützung bei Computer- und Layoutfragen.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jasmin Siewert
Geburtsdatum: 11. November 1984
Geburtsort: Minden (Westfalen)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1991 - 1995 Grundschole Holzhausen, Porta Westfalica
1995 - 2004 Gymnasium Porta Westfalica, Porta Westfalica
Abschluss: Abitur

Studium

Oktober 2004 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Januar 2008 Promotion bei Frau Prof. Dr. med. Regine Gläser an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Thema: „Einfluss von Adipokinen auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden in humanen Keratinozyten“
April 2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, schriftlicher Teil
Juni 2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, mündlicher Teil

Veröffentlichungen

Februar 2010 Teile dieser Arbeit wurden bei der 37. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V. in Lübeck präsentiert:
J. Siewert, M. Rostami-Yazdi, J. Harder, U. Mrowietz, R. Gläser (2010): Induction of antimicrobial peptide expression by adipokines in human keratinocytes. *Experimental Dermatology*: 183