

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

**EINFLUSS VON FUMARSÄUREESTERN AUF DIE EXPRESSION UND  
REGULATION ANTIOXIDATIVER MECHANISMEN IN PRIMÄREN HUMANEN  
KERATINOZYTEN**

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

vorgelegt von  
**CHRISTINA DIERKS**  
aus Neu- Kaliß

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Mrowietz
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. J.-M. Schröder
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2014
- Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 23.01.2014

gez.: Prof. Dr. J. Roider  
Vorsitzender d. Ausschusses f. Promotion

*„Far better an approximate answer to the right question,  
which is often vague,  
than the exact answer to the wrong question,  
which can always be made precise.“*

-John W. Tukey-

*In Gedenken an meinen Opa*

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Psoriasis	1
1.1.1. Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2. Formen	2
1.1.3. Therapie	3
1.2. Fumaderm <sup>®</sup> und der Stellenwert von DMF	4
1.3. Immunreaktionen in psoriatischen Läsionen	4
1.3.1. Immunmodulation durch Fumarsäureester	5
1.4. Oxidativer Stress und die antioxidative Wirkung von DMF	8
1.5. NRF-2 Signalweg und die Rolle der Phase-2-Proteine HO-1 und NQO-1	9
2. Zielsetzung der Arbeit	12
3. Material und Methoden	13
3.1. Kultivierung und Subkultivierung humaner Keratinozyten	13
3.2. Inkubation der NHEK	13
3.2.1. Stimulation mit 10 $\mu$ M DMF und MMF	13
3.2.2. Stimulation mit 1 $\mu$ M und 5 $\mu$ M DMF und MMF	14
3.3. RNA- Isolierung aus NHEK	14
3.4. Bestimmung der RNA Konzentration	15
3.5. Reverse Transkription (cDNA- Synthese)	15
3.6. Realtime quantitative PCR	16
3.6.1. Daten Analyse	17
3.7. Durchflusszytometrie	18
3.7.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	18
3.7.2. Fixation und Permeabilisierung	19
3.7.3. Analyse der Zellsuspension	20
3.8. Nachweis von NRF-2 mittels indirekter Immunfluoreszenz	20
4. Ergebnisse	22
4.1. Ergebnisse der quantitativen Realtime-PCR	22
4.1.1. Untersuchung der Transkripte unter 10 $\mu$ M DMF und MMF, sowie 1mM NAC in normalen humanen Keratinozyten	22

4.1.1.1. Analyse der HO-1 Transkripte	22
4.1.1.2. Ermittlung der NQO-1 Expression	23
4.1.1.3. Untersuchung der NRF-2 Expression	24
4.1.2. Untersuchung der Transkripte unter 1µM und 5µM DMF und MMF, sowie 1mM NAC in normalen humanen Keratinozyten	25
4.1.2.1. Analyse der HO-1 Transkripte	25
4.1.2.2. Ermittlung der NQO-1 Expression	26
4.1.2.3. Untersuchung der NRF-2 Expression	27
4.2. Proteinnachweis mittels Durchflusszytometrie	28
4.2.1. Analyse von HO-1	29
4.2.2. Untersuchung der NQO-1 Fluoreszenz	30
4.2.3. Analyse von NRF-2	30
4.3. Analyse des Transkriptionsfaktors NRF-2 mittels indirekter Immunfluoreszenz	31
5. Diskussion	33
6. Zusammenfassung	42
7. Literaturverzeichnis	44
8. Danksagung	52
9. Lebenslauf	53

## Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator protein-1
ARE	Antioxidant responsive element
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
BG-12	BG00012/FAG-201
BACH	BRCA1-associated CT Helicase
BRCA	Breast cancer
BSA <sup>1</sup>	Body surface area
BSA <sup>2</sup>	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
Ct	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLQI	Dermatology life quality index
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility-shift assay
FAM <sup>TM</sup>	Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GST-Ya	Glutathion-S-Transferase Ya
$\gamma$ -GCL	$\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$

HLA	Human leukocyte antigen
HO-1	Hämoxygenase- 1
Hprt	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase
HK-2 Zellen	Human kidney-2 Zellen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMID	Immune mediated inflammatory diseases
KEAP 1	Kelch-like-ECH-associated protein 1
MACS	Magnetic cell separation
MAF	Musculoaponeurotic-fibrosarcoma virus
MEF	Monoethylfumarat
MMF	Monomethylfumarat
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NAC	N-Acetylcystein
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrogen
NF $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHEK	Normal human epidermal keratinocytes
NQO-1	NADP(H):quinone-oxygenase-1
NRF-2	NF-E2-related factor-2
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
O <sub>3</sub>	Ozon
OH	Hydroxyl-Radikale
PASI	Psoriasis area and severity index
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PIC	Proteinase inhibitor cocktail
PSORS	Psoriasis susceptibility loci
qRT- PCR	quantitative Realtime- Polymerasekettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor
Spr2d/h	Small proline-rich protein 2D/H
TAMRA™	Tatramethylrhodamin
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNS	Trypsin Inhibitor Solution (0,05% Trypsin Inhibitor, 0,1% BSA)
Trizol	Phenol-Guanidinisothiocyanat (GTC) - Gemisch
UNG	Uracil-N-Glycosylase
USF-1	Upstream transcription factor-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1



## **1. Einleitung**

### **1.1. Psoriasis**

Psoriasis ist eine chronische rezidivierende und inflammatorische Dermatose, von der 1,5-2% der mitteleuropäischen Bevölkerung und damit allein in Deutschland rund 1,6 Millionen Menschen betroffen sind. [1] Aufgrund der zumeist lebenslangen Krankheitsverläufe, führt die Psoriasis nicht nur zu physischen, sondern auch zu psychischen Symptomen wie Stigmatisierung und soziale Ausgrenzung.

Eine amerikanische Studie ergab, dass die Einschränkung der Lebensqualität bei Psoriasis-Patienten ähnlich ausgeprägt ist, wie bei Patienten mit Depression, Diabetes mellitus und malignen oder kardialen Erkrankungen. [2]

#### **1.1.1. Ätiologie und Pathogenese**

Obwohl schon der Arzt Galenus (um 129 n. Chr. - 199 n. Chr.) den Begriff erstmalig prägte, ist bis heute die Ätiologie der Psoriasis weitestgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass es sich um eine multifaktorielle Genese handelt, bei der sowohl Umweltfaktoren, als auch immunologische und genetische Komponenten eine Rolle spielen. Bisher konnten zwölf genetische Suszeptibilitätsloci identifiziert werden, wobei PSORS-1 (Psoriasis susceptibility loci-1) auf Chromosom 6p21 der bedeutendste zu sein scheint. Aber auch Varianzen in der kodierenden Region für TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und IL-23 (Interleukin-23) tragen vermutlich zur Entwicklung der Psoriasis bei. [3]

Die Auslöser der Psoriasis sind vielfältig. So kommen sowohl intrinsische (Entzündungen, Medikamente), als auch externe Trigger (mechanische Reizung) in Betracht. Der Stimulus bewirkt eine kutane Aktivierung von dendritischen Zellen, welche vermehrt proinflammatorische Zytokine (u.a. TNF $\alpha$ , IL-12, IL-23) sezernieren. T-Zellen differenzieren zu T<sub>H</sub> (T-Helferzellen)1- und T<sub>H</sub>17-Zellen. In Form eines Circulus vitiosus kommt es dabei zu einer sich selbst unterhaltenden Entzündungsreaktion und Hyperproliferation der Keratinozyten (Akanthose) mit konsekutiver Differenzierungsstörung (Parakeratose). Chemotaktische Zytokine induzieren desweiteren die Migration neutrophiler Granulozyten in die Epidermis, welche dort das typische Bild der Munroschen Mikroabzesse erzeugen können. [4]

Aufgrund dieser ausgeprägten immunvermittelten Mechanismen wird die Psoriasis derzeit, neben Morbus Crohn und der Rheumatoiden Arthritis, zu den IMID (immune mediated inflammatory diseases) gezählt. [1]

Auffallend häufig besteht eine Assoziation zwischen Psoriasis und Erkrankungen wie Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom mit Adipositas, Hypertonie und Dyslipidämie, sowie psychischen Störungen. [5]

### **1.1.2. Formen**

Es werden zwei Typen der Psoriasis unterschieden. Typ 1 beschreibt eine Erstmanifestation vor dem 40. Lebensjahr (60-70%) mit einer Neigung zu eher schweren Krankheitsverläufen. Meist können eine familiäre Häufung, sowie HLA- (Human leukocyte antigen) Assoziationen (HLA-Cw6,-DR7) nachgewiesen werden. Bei der Typ 2- Psoriasis hingegen manifestiert sich die Erkrankung erst nach der 4. Lebensdekade und nimmt meist einen milden Verlauf. Die Familienanamnese der Patienten zeigt sich bezüglich Psoriasis-erkrankungen negativ. Im Gegensatz zum Typ 1 bestehen keine Verbindungen zu den typischen genetischen Markern. [1,6]

Die mit Abstand verbreitetste Form stellt die Psoriasis vulgaris mit einer Häufigkeit von 80% dar. Hierbei zeigen sich charakteristische scharf begrenzte, erythematöse, silbrig schuppene Plaques. Zu den Prädispositionsstellen zählen der behaarte Kopf, die Streckseiten der Extremitäten und die Lumbosakralregion. Psoriasis palmoplantaris (Handflächen und Fußsohlen betroffen), Psoriasis inversa (Effloreszenzen an den Beugeseiten) und die Psoriasis intertriginosa (Befall der großen Hautfalten) zählen zu den Sonderformen der Psoriasis vulgaris. [1,4]

Die exanthematische Psoriasis guttata zeigt hingegen eher tropfenförmigen Effloreszenzen im Bereich des Stammes. Diese Erkrankung tritt zumeist nach Infekten im Kindes- und Jugendalter auf. [4]

Abweichend von der typischen Morphologie, zeigt die Psoriasis pustulosa ein anderes klinisches Bild. Es imponieren sterile, spongioforme Pusteln auf gerötetem Grund am Rand von Psoriasis-Läsionen (Psoriasis cum pustulatione) oder am gesamten Integument (Typ von Zumbusch). Ein Übergang von einer Psoriasis vulgaris in die Psoriasis pustulosa ist möglich. [4]

Ein schweres Bild stellt die psoriatische Erythrodermie mit dem Befall des gesamten Integuments dar. Aufgrund der massiven Entzündungsreaktion, haben die Patienten häufig ein schweres Krankheitsgefühl mit Fieber, Schüttelfrost, sowie Muskel- und Gliederschmerzen. [7]

In etwa 20% der Fälle liegt entweder vorangehend oder zeitgleich eine Psoriasis-Arthritis vor. Wie bei der ankylosierenden Spondylitis besteht häufig eine HLA-B27-Assoziation, Rheumafaktoren sind hingegen negativ. Neben den vorrangig betroffenen kleinen Gelenken wie den distalen und proximalen Interphalangealgelenken von Händen und Füßen, kann es auch zum Befall der Iliosakralgelenke und von Sehnenansätzen (Enthesis) kommen. [1]

Bei ca. 30% der Patienten kommt es zusätzlich zur Ausbildung einer Nagelpsoriasis mit dem typischen Erscheinungsbild (Ölflecken, Tüpfel- und Krümelnägel). Interessanterweise zeigen 80-90% der Patienten mit Psoriasis-Arthritis im Laufe der Zeit diese Veränderungen. [1]

### **1.1.3. Therapie**

Die Einteilung des Schweregrades und damit die Entscheidung über Möglichkeiten der Therapie, erfolgt anhand vieler verschiedener Messinstrumente, welche sowohl das klinische Bild als auch die Einschränkung der Lebensqualität erfassen. Obwohl es kein allgemein gültiges Vorgehen gibt, hat sich vor allem die Beurteilung mittels PASI (Psoriasis area and severity index), BSA (Body surface area), sowie DLQI (Dermatology life quality index) durchgesetzt. Eine milde Psoriasis besteht bei einem  $PASI \leq 10$  und  $BSA \leq 10$  und  $DLQI \leq 10$ . Um eine mittelschwere bis schwere Form handelt es sich bei einem  $PASI > 10$  oder  $BSA > 10$  und  $DLQI > 10$ . [8]

Bei Vorliegen einer milden Psoriasis, ist meist die alleinige Behandlung mit lokalen Therapeutika ausreichend. Es stehen verschiedene antientzündliche und antiproliferative Medikamente wie Dithranol (Cignolin), lokale Glukokortikosteroide und Vitamin D3-Analoga (z.B. Calcipotriol) zur Verfügung. Je nach Ansprechen ist die Kombination mit einer UV-Therapie möglich. [4]

In der Therapie der mittelschweren und schweren Psoriasis stellen neben Acitretin, Methotrexat, Ciclosporin und Biologicals, Fumarsäureester heute ein wichtiges Medikament dar. Seit 1994 steht in Deutschland dafür Fumaderm<sup>®</sup> mit dem Hauptbestandteil DMF (Dimethylfumarat) zur Verfügung. [9]

## 1.2. Fumaderm<sup>®</sup> und der Stellenwert von DMF

Zur Therapie der mittelschweren bis schweren Psoriasis wird heute zunehmend das Medikament Fumaderm<sup>®</sup> eingesetzt. Neben dem Hauptbestandteil DMF sind weiterhin verschiedene MEF-Salze (Monoethylfumarat-Salze) enthalten. Sowohl DMF als auch MEF zählen zu der Gruppe der Fumarsäureester. [10]

Aufgrund des Nutzen-Risiko-Profiles, ist Fumaderm<sup>®</sup> auch zur Langzeitanwendung geeignet und wird laut S3-Leitlinie sowohl für die Induktions- als auch für die Langzeittherapie empfohlen. [4,11]

Besonders in Hinblick auf die häufig mit Psoriasis assoziierte Komorbidität (siehe 1.1.1.), zeigen sich Vorteile der möglichen Langzeitanwendung. Klinische Studien zeigen, dass das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen mit dem Schweregrad der Psoriasis korreliert. [12] Eine optimale Langzeittherapie, vor allem bei andauernder und hoher Krankheitsaktivität, kann somit zu einer deutlichen Reduktion dieser Risiken beitragen. Der Aspekt, dass Fumaderm<sup>®</sup> nicht über die körpereigenen P450-Enzyme metabolisiert wird, erleichtert die Anwendung, da viele Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten umgangen werden können. Häufige Nebenwirkungen sind, insbesondere in den ersten Monaten der Therapie, gastrointestinale Beschwerden, Hitzegefühl und/oder plötzliche Gesichtsrötung („Flush“), Lymphozytopenie und eine transiente Eosinophilie. [9,13] Daraus resultierende Kontraindikationen sind beispielsweise chronische gastrointestinale Erkrankungen, Leukozytopenien, sowie aufgrund geringer Erfahrungen Schwangerschaft, Stillzeit und maligne Erkrankungen in der Anamnese.

## 1.3. Immunreaktionen in psoriatischen Läsionen

Kennzeichnend für psoriatische Läsionen ist das vermehrte Vorkommen von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen. [4] T<sub>H</sub>17-Zellen umfassen eine besondere Gruppe der T-Helferzellen. Die Bildung erfolgt unter den Einfluss von IL-12 und IL-23. T<sub>H</sub>17-Zellen produzieren das vermehrt in psoriatischen Läsionen vorkommende IL-17 und IL-22 und tragen damit entscheidend zur Ausbildung der kutanen Veränderungen bei. [4]

T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren vorrangig proinflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), TNF $\alpha$  und IL-2. Letzteres ist die Ursache für die Selbstunterhaltung der Entzündungsreaktion und gilt als stärkster Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten. So stimuliert IL-2 nicht nur die Ausschüttung anderer proinflammatorischer Stoffe, sondern wirkt rückkoppelnd auf weitere

T<sub>H</sub>1-Zellen, die folgend erneut IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 sezernieren. [14] Auch Makrophagen werden durch dieses Zytokinmilieu aktiviert und zur Sekretion von IL-23 und IL-12 angeregt, welche den Entzündungsprozess weiter voran treiben. IL-12 stellt ein typisches Zytokin zur Stimulation von T<sub>H</sub>1-Zellen dar und fördert die Differenzierung naiver T-Helferzellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen. Zusammen mit IFN $\gamma$  inhibiert IL-12 gleichzeitig die Ausbildung und Aktivierung von T<sub>H</sub>2-Zellen. [15]

Heute wird angenommen, dass eine Vielzahl der pathologischen Vorgänge der Psoriasis über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) vermittelt wird. IL-12 und IL-23 führen zu einer vermehrten T<sub>H</sub>1-Zell-Differenzierung mit konsekutiver Sekretion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Der NF $\kappa$ B-Signalweg wird aktiviert. [16] Neben der Hemmung von apoptotischen Vorgängen führt die Stimulation von NF $\kappa$ B zur vermehrten Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen. [17,18] NF $\kappa$ B steigert die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$ . [19-23] TNF $\alpha$  selbst wirkt aktivierend auf den NF $\kappa$ B-Signalweg und induziert weiterhin die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle des Endothels, die weiteren Immunzellen die Migration in das betroffene Gewebe erleichtern. Dazu zählen unter anderem ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) und E-Selektin. [24-26]

Diese Erkenntnisse zusammenfassend bedingt die ausgeprägte Komplexität des Zytokinmusters psoriatischer Läsionen zum einen eine sich chronisch selbst unterhaltende Entzündungsreaktion und führt zum anderen zu einer massiven Störung der Keratinozyten. Die Folge sind Hyperproliferation und Differenzierungsstörungen (Hyperparakeratose).

### **1.3.1. Immunmodulation durch Fumarsäureester**

Gegenwärtig werden Fumaderm<sup>®</sup> sowohl immunmodulatorische als auch antiinflammatorische Effekte in der Therapie der Psoriasis zugeschrieben. So belegen Studienergebnisse der letzten Jahre das Auftreten einer zwar geringfügigen, aber deutlichen Leukozytopenie bei einem Großteil der Patienten mit Reduktion vor allem von T-Zellen. CD (Cluster of differentiation) 4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigen unter der T-Zellpopulation dabei eine annähernd gleiche Abnahme. [27] Neben der Reduktion von T-Zellen, zeigt sich auch eine Verminderung von neutrophilen Granulozyten in psoriatischen Läsionen. [28]

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass die positiven Effekte von Fumaderm<sup>®</sup> auf eine vermehrte Bildung von T<sub>H</sub>2-Zellen mit konsekutiver Unterdrückung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen, zurückzuführen sind. Bisher konnte diese Annahme jedoch nicht eindeutig bestätigt werden. So zeigten Litjens et al. in vitro zwar eine Reduktion von T<sub>H</sub>1-Zellen unter Behandlung mit Fumarsäureestern, jedoch ohne Induktion spezifischer T<sub>H</sub>2-Zytokine. [29]

Trotz anhaltender Forschungen sind sowohl wirksame Komponente von Fumaderm<sup>®</sup>, als auch angesteuerte Signalkaskaden ungeklärt. Die derzeitige Forschung stützt sich sowohl auf die Untersuchung der MEF-Komponente, als auch auf DMF und dessen Hydrolyseprodukt MMF (Monomethylfumarat).

Nieboer et al. widerlegten in einer 1989 durchgeführten klinischen Studie mit 36 Psoriasis Patienten, eine Wirksamkeit von MEF. Ausschließlich DMF zeigte gegenüber Placebo eine klinische Verbesserung der Läsionen. Zwischen der Wirkung von MEF und Placebo ergaben sich keine Unterschiede. [30] Eine Folgestudie, bei der ein Patientenkollektiv ausschließlich mit DMF und ein anderes mit einem Kombinationspräparat aus DMF und MEF behandelt wurde, zeigte eine gleichermaßen ausgeprägte Besserung der Läsionen unter beiden Therapieformen. [31]

Die Hydrolyse von DMF erfolgt durch unspezifische Esterasen zu MMF. Monomethylfumarat wird weiter gespalten zu Fumarsäure und dieses letztlich als Wasser und Kohlenstoffdioxid eliminiert. Auch Fumarsäure stand im Mittelpunkt einiger Forschungsgruppen bei der Aufklärung der wirksamen Komponente von Fumaderm<sup>®</sup>. Hypothesen zu dessen Wirksamkeit konnten bisher jedoch nicht bestätigt werden. Schon Schweckendiek, ein deutscher Chemiker, stellte 1959 als er an Psoriasis erkrankte, fest, dass sich die Läsionen nur unter Einnahme von Fumarsäureestern, nicht jedoch unter Fumarsäure besserten. [32] Vandermeeren et al. unterstützten diese Beobachtung 1997 in vitro. Unter Inkubation mit Fumarsäure zeigte sich keine Beeinflussung der Expression von Adhäsionsmolekülen in humanen Endothelzellen. [33]

#### *b) Immunmodulation durch DMF*

Während MEF und Fumarsäure keine Wirkungen auf psoriatische Läsionen zugeschrieben werden konnten, erzielten Untersuchungen mit Dimethylfumarat hingegen positive Ergebnisse.

Bei der Vermittlung der immunmodulatorischen Wirkungen durch DMF sprechen eine Vielzahl von Untersuchungen NF $\kappa$ B eine Schlüsselrolle zu. Es wird angenommen, dass Dimethylfumarat eine Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalweges bewirkt. [34,35]

Untersuchungen zeigen, dass eine konsekutiv fehlende Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern zur Induktion proapoptotischer Prozesse führt. Treumer et al. belegten eine gesteigerte Apoptose unter Inkubation mit Dimethylfumarat in humanen T-Zellen. Hintergrund ist eine durch DMF ausgelöste verminderte Expression von Bcl-2 (B-cell-lymphoma-2), einem durch NF $\kappa$ B transkribierten, antiapoptotischen Molekül. [36]

DMF scheint desweiteren einen antiinflammatorischen Effekt zu entfalten. Die Sekretion von Chemokinen wird gehemmt [37] und Vandermeeren et al. konnten 1997 eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen in humanen Endothelzellen unter DMF nachweisen. VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin wurden vermindert gebildet. [33]

Ockenfels et al. unterstützten die Annahme der entzündungshemmenden Wirkung von DMF. Neben einer Hemmung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen wurde eine Induktion von IL-10 in Keratinozyten nachgewiesen. [38] IL-10 stellt einen wichtigen Baustein antiinflammatorischer Prozesse dar. Sowohl die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ ), als auch die Antigen-Präsentation an T-Zellen werden durch IL-10 inhibiert. [39,40] Zhu und Mrowietz bestätigten die verminderte Antigen-Präsentation unter DMF über den Nachweis, dass Dimethylfumarat eine Hemmung der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen induziert. [41] Eine Hemmung von IL-2 und IL-4 durch Dimethylfumarat konnte in vitro nicht bestätigt werden. [42]

Zusammenfassend sprechen viele Forschungsergebnisse für DMF als wirksame Komponente von Fumaderm<sup>®</sup>. Lange Zeit wurde im Plasma von Patienten nach oraler Gabe von Dimethylfumarat ausschließlich MMF nachgewiesen. [43] DMF konnte hingegen nicht gefunden werden, was an der Wirkung dessen aufgrund der scheinbar fehlenden Bioverfügbarkeit zweifeln ließ. Eine kürzlich publizierte Untersuchung konnte allerdings die Mercaptursäure eines DMF-Glutathion-Adduktes im Urin von Psoriasis Patienten unter Fumaderm<sup>®</sup>-Therapie detektieren. [44]

### *c) Immunmodulation durch MMF*

Da lediglich Monomethylfumarat nach oraler Gabe von DMF im Plasma von Psoriasis Patienten detektiert werden konnte, rückte auch MMF zunehmend in den Mittelpunkt verschiedener Untersuchungen. Aktuell zeigt sich die Datenlage der in vitro Wirkungen von Monomethylfumarat jedoch eher kontrovers.

Eine Vielzahl an Untersuchungen belegen einen positiven Effekt von MMF auf die Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen. De Jong et al. wiesen 1996 eine vermehrte Produktion von IL-4 und IL-5 in mononuklearen und T-Zellen nach. TNF $\alpha$  und IL-10 wurden unter MMF vermehrt gebildet. [45] Hingegen stellten Lehmann et al. keine Wirkung von MMF auf die Zytokinsekretion dar. [42] Ein Effekt auf die T<sub>H</sub>1-Zytokine IL-2 und IFN $\gamma$  konnte bisher nicht nachgewiesen werden. [46]

Wie DMF scheint MMF ebenfalls indirekt die Antigen-Präsentation an T-Zellen zu beeinflussen. Zhu und Mrowietz wiesen in vitro eine Hemmung der Monozyten-Differenzierung zu dendritischen Zellen nach. [41] Eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von Adhäsionsmolekülen oder Sekretion von Chemokinen besteht im Gegensatz zu DMF nicht. [33,46]

Divergent zeigen sich desweiteren die Ergebnisse bezüglich des Einflusses von MMF auf die Zellproliferation. Ergebnisse der Forschungsgruppe de Jong et al. belegten keine Beeinflussung der Zellproliferation von aufbereiteten T-Zellen [46], während Nibbering et al. 1997 MMF einen hemmenden Einfluss auf Keratinozyten nachweisen konnten. [47] Interessanterweise zeigen aktuelle Studien eine verminderte Abstoßungsrate bei Nierentransplantaten im Rattenmodell und bestätigen die Annahme einer immunsuppressiven Wirkung von MMF. [48]

Obwohl Litjens et al. neben DMF auch MMF eine Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalweges nachweisen konnten [49], gibt es bisher keinen eindeutigen Beleg für die Induktion von Apoptose durch MMF. [36]

## **1.4. Oxidativer Stress und die antioxidative Wirkung von DMF**

Laut in vitro Untersuchungen an Caco-2 Monolayern erfolgt die intrazelluläre Aufnahme von DMF über einen Transportermechanismus. [50] DMF stellt einen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten



Carboxylsäure-Ester dar und kann somit spontan mit Thiolen reagieren. Zu der Gruppe der Thiole zählt unter anderem Glutathion (GSH). Ergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass die Bildung eines DMF-GSH Adduktes initial zu einer GSH-Depletion und damit zur Entstehung eines oxidativ geprägten Milieus in der Zelle führt. Reaktiv auf den intrazellulären GSH Mangel kommt es zur Aktivierung der Glutathion de-novo-Synthese mit konsekutivem Anstieg der GSH-Spiegel. [51,52]

Neben einer DMF-induzierten GSH-Depletion kann die Zelle direkten Stimuli ausgesetzt sein, die zu einer Änderung in ein oxidativ geprägtes Milieu führen. Zu direkten Stimuli zählen ROS (Reactive oxygen species), die unter bestimmten Bedingungen (UV- Strahlung, ionisierende Strahlung) entstehen. Neben Proteinoxidation, Lipidperoxidation und DNA-Schäden führen diese zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Typische ROS sind unter anderem Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Hydroxyl-Radikale (OH), aber auch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Ozon ( $O_3$ ). In der Regel ist der menschliche Organismus ausreichend gut in der Lage, Sauerstoffradikale zu eliminieren. Bei ungenügenden Abbau oder sogar Überschuss kommt es jedoch zur Entstehung von oxidativen Stress. [53]

Umso wichtiger scheint eine optimale Kompensation im Organismus zu sein. Bei Induktion von oxidativem Stress erfolgt die Bildung von verschiedenen antioxidativ wirkenden Stoffen, wie Katalase, Harnsäure, Ferritin und Glutathion-Reduktase. Aber auch über die Nahrung aufgenommene Substanzen können antioxidativ wirken (Vitamin C, Vitamin E u.a.). [54]

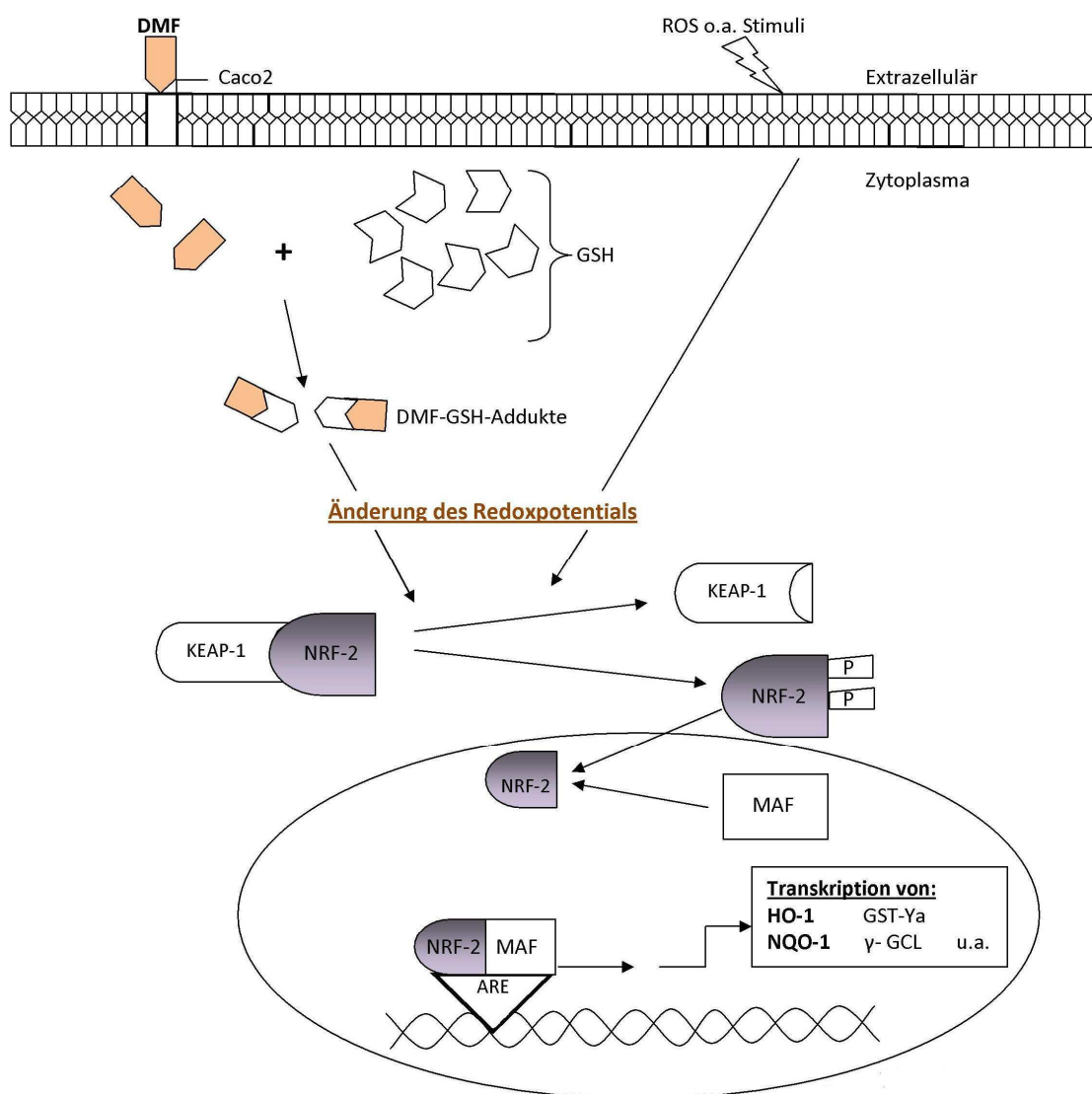
Eine Vielzahl an Forschungsgruppen untersuchten mögliche gegenregulatorische Mechanismen, die bei oxidativem Stress kompensatorisch aktiviert werden könnten: [15]

1. Hemmung der AP-1 (Activator protein-1) Signalkaskade
2. Hemmung des Janus-Kinase-Signalweges
3. Hemmung von NFκB
4. Induktion der NRF-2 (NF-E2-related factor-2) Signalkaskade

### **1.5. NRF-2 Signalweg und die Rolle der Phase-2-Proteine HO-1 und NQO-1**

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF-2 stellt neben der NFκB-Hemmung eine Möglichkeit für die zelluläre Bewältigung von oxidativem Stress dar. Intrazellulär liegt NRF-2 gebunden an KEAP-1 (Kelch-like-ECH-associated protein-1), einem inhibitorischen

Molekül, vor, welches die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nucleus verhindert. Unterliegt die Zelle oxidativem Stress (z.B. durch erhöhte ROS-Level), kommt es zu einer Konformationsänderung von KEAP-1, zum anderen phosphorylieren spezifische Kinasen NRF-2. Es folgt die Spaltung des Heterodimers und NRF-2 transloziert in den Zellkern. Dort erfolgt zusammen mit MAF (Musculoaponeurotic-fibrosarcoma virus) die Bindung an ARE (Antioxidant responsive element) und die Induktion der Transkription verschiedener antiinflammatorischer Zytokine (**Abb.1**). [55-57] Dazu zählen neben Glutathion-S-Transferase-Ya (GST-Ya),  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL) und Thioredoxin auch HO-1 (Hämoxxygenase 1) und NQO-1 (NADP(H):quinone-oxygenase-1). [58,59]



**Abb.1:** NRF-2 Signalweg

HO-1 und NQO-1 zählen zur Gruppe der Phase-2 Proteine und dienen der Zelle zum Schutz vor oxidativen Stress. Dabei stellen beide indirekte Antioxidantien dar. Ein großer Vorteil gegenüber direkt antioxidant wirkenden Stoffen liegt dabei in der längeren Halbwertszeit und ein dadurch bedingt längeren Schutz vor oxidativem Stress. Um ihrer Funktion als Antioxidantien gerecht zu werden, induzieren sie eine Vielzahl verschiedener zellprotektiver Reaktionen.

HO-1, auch als Hitzeschock Protein 32 bezeichnet, stellt ein indirektes Antioxidans dar, indem es nicht selbst zur Herstellung des oxidativen Gleichgewichts beisteuert, sondern die Bildung weiterer antioxidativ wirkender Substanzen induziert. HO-1 katalysiert innerhalb des Häm-Signalweges den Abbau von Häm zu Biliverdin. Biliverdin wird weiter durch eine Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin gespalten. Bilirubin ist dabei ein potent antioxidativ wirkender Stoff. [60] Schon 1986 wurde HO-1 in Rattenlebern entdeckt und im Laufe der Zeit in weiteren Organen und auch Immunzellen gefunden. [61-65]

Ein weiteres Phase-2-Protein, welches über den NRF-2-Signalweg gebildet wird, ist das Flavoenzym NQO-1. Als Homodimer reduziert NQO-1 vorrangig Chinolone zu Hydrochinonen und verhindert damit das Entstehen freier Sauerstoffradikale. Für diese Funktion werden Elektronen-Donoren wie NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen) oder NAD(P)H (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrogen) benötigt. [66]

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Psoriasis führt zu einer hochgradigen Störung der Epidermopoese durch Veränderung der epidermalen Keratinozyten mit konsekutiver Barrierestörung. Durch äußere Einflüsse und die Entzündungsreaktion kommt es zu einem stark oxidativ geprägten Milieu. Die anti-oxidative Wirkung der Fumarsäureester, besonders von DMF, besitzt daher einen wichtigen therapeutischen Effekt. Daher basiert die vorliegende Dissertation auf der Untersuchung der NRF-2 Kaskade von primären humanen Keratinozyten. Bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF-2 kommt es vermutlich neben einer Expression von GST-Ya, Thioredoxin und  $\gamma$ -GCL, auch zur einer vermehrten Produktion von HO-1 und NQO-1. [58,59]

Hämoxygenase-1 scheint einen besonderen Stellenwert bei der Pathogenese der Psoriasis einzunehmen. Untersuchungen der letzten Jahre belegen ein erhöhtes Vorkommen von HO-1 in psoriatischen Läsionen. [67] Desweiteren konnte eine Induktion von HO-1 durch GSH-Depletion unter DMF in vitro nachgewiesen werden. [42] Ausgehend von der Annahme, dass die Aktivierung des NRF-2-Signalweges zu dieser vermehrten Expression führt, wird in der vorliegende Arbeit der Zusammenhang zwischen beiden Komponenten untersucht.

NQO-1 war bisher in nur wenigen Publikationen Bestandteil der Untersuchungen, sodass ein weiteres Ziel der Dissertationsarbeit war, inwiefern auch NQO-1 dem NRF-2-Signalweg in Keratinozyten unterliegt und ob Dimethylfumarat NQO-1 als antientzündliche Substanz in vitro induzieren kann. Zwar konnte gezeigt werden, dass NQO-1 unter DMF vermehrt in Neurogliazellen gebildet wird [68], bezüglich einer Expression in Keratinozyten und bei Psoriasis liegen bislang jedoch keine Untersuchungen vor.

Neben dem genauen Wirkmechanismus ist die Frage nach der wirksamen Substanz von Fumaderm<sup>®</sup> bis heute nicht übereinstimmend geklärt. Um die aktive Wirkkomponente weiter zu verifizieren, wurde die Bildung von NRF-2, HO-1 und NQO-1 auch unter Monomethylfumarat, einem Hydrolyseprodukt von DMF, untersucht.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Kultivierung und Subkultivierung humaner Keratinozyten**

Normale humane epidermale Keratinozyten (Normal human epidermal keratinocytes, NHEK, Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) wurden in eine 75cm<sup>3</sup> Flasche mit 15ml Medium (Keratinocytes Growth Medium 2, Promo Cell) ausgesetzt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte täglich.

Nach 5-7 Tagen zeigte sich ein konfluenten Zellrasen. Zur Subkultivierung wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellen mit PBS (Phosphate buffered saline, PAA Laboratories, Pasching, Deutschland) gespült und anschließend mit 0,04% Trypsin/ 0,03% EDTA (Ethyldiamintraessigsäure, Promo Cell) und TNS (Trypsin Inhibitor Solution, Promo Cell) unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst. Nach Zentrifugation (1000U/min, 24°C, 5Min.) konnten die Zellen in 1ml Medium aufgenommen werden. Die Subkultivierung erfolgte in einer 24-Loch-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit je 10<sup>5</sup> Zellen und 1ml Medium pro Loch.

#### **3.2. Inkubation der NHEK**

##### **3.2.1. Stimulation mit 10µM DMF und MMF**

Nach einem weiteren Tag unter Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> waren die Zellen der 24-Loch-Platte zusammen gewachsen. Für die nachfolgende Stimulation wurden DMF und MMF in DMSO (Dimethylsulfoxid), sowie NAC (N-Acetylcystein) in PBS gelöst (DMF, MMF, NAC, DMSO: Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland). Der DMSO Gehalt der Lösungen betrug 0,01%.

Untersucht wurde zunächst ein zeitlicher Verlauf der HO-1, NQO-1 und NRF-2 Expression unter je 10µM DMF, MMF und 1mM NAC. Dazu wurden die Zellen nach vorherigem Mediumwechsel unterschiedlich lang stimuliert (2h, 4h, 6h, 24h).

Als Kontrolle dienten NHEK, die ausschließlich mit 0,01% DMSO (gelöst in PBS) stimuliert wurden.

Zur Analyse eines hemmenden Effektes von N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression von HO-1, NQO-1 und NRF-2 unter DMF und MMF, wurde jeweils ein Ansatz mit NAC für eine Stunde vorbehandelt und folgend mit DMF und MMF über die jeweiligen Zeiträume

inkubiert. Vor Zugabe der Fumarsäureester erfolgte hierbei zuvor ein Mediumwechsel. Als Kontrollen dienten NHEK, die nach einer Stunde mit 0,01% DMSO (Lösungsmittel von DMF und MMF) versetzt wurden.

### **3.2.2. Stimulation mit 1 $\mu$ M und 5 $\mu$ M DMF und MMF**

Ein weiterer Ansatz galt der von NHEK unter je 1 $\mu$ M und 5 $\mu$ M DMF und MMF. Untersucht wurde ausschließlich der Effekt nach 6h, da sich besonders zu diesem Zeitpunkt in den Vorversuchen (siehe 2.2.) eine deutliche Änderung der Expression von HO-1, NQO-1 und NRF-2 zeigte. Die Zellen wurden wie unter 2.2. beschrieben, stimuliert.

### **3.3. RNA-Isolierung aus NHEK**

Das Medium wurde zu den beschriebenen Zeitpunkten abgenommen und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Durch Zugabe und mehrmaligen Spülen mit 0,5ml Trizol (Phenol-Guanidinisothiocyanat(GTC)-Gemisch, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) pro Vertiefung der 24-Loch-Platte wurden die NHEK lysiert.

Zur Phasentrennung wurde zu den in Trizol aufgenommenen NHEK 100 $\mu$ l Chloroform gegeben. Nachfolgend wurden die Proben für 10 Minuten geschwenkt und dann bei 13000U/min und 4°C über 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend ließ sich eine Auftrennung des Gemisches in drei Phasen erkennen: die oberste wässrige Phase (RNA enthaltend), die Interphase mit größeren DNA-Fragmenten, sowie die organische Phase bestehend aus Proteinen und kleineren DNA-Fragmenten. Die organische Phase und die Interphase wurden verworfen, die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA erfolgte die Zugabe von 250 $\mu$ l 70%igen Isopropanol.

Nach erneuten zehnmütigen Schwenken der Proben wurden diese für eine Stunde bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut und anschließend zentrifugiert (13 000U/min, 10Minuten, 4°C). Überschüssiges Isopropanol wurde vom entstandenen Pellet abgenommen. Um verbliebene Salze und Isopropanol-Reste zu beseitigen, erfolgte die Zugabe von 500 $\mu$ l 75%igen Ethanol. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (11 000U/min, 5Minuten, 4°C) und das übrige Ethanol mittels Pipette und Thermomixer (56°C, Eppendorf 5436, Hamburg, Deutschland) entfernt. Zur Stabilisierung der RNA wurden die Proben in 20 $\mu$ l RNA/DNA-freiem Wasser (Aqua ad injectabilia, Braun AG, Melsungen, Deutschland) aufgenommen und für die bessere Löslichkeit bei 56°C im Thermomixer unter Rotation vermengt.

### 3.4. Bestimmung der RNA- Konzentration

Der Nukleinsäuregehalt in den Proben wurde mittels Nano Drop (Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland) photometrisch über eine Absorptionsmessung bei 260nm (A260) bestimmt. Dabei entspricht eine A260-Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40ng/μl.

Zur Quantifizierung der Nukleinsäurelösung wurden die Proben weiterhin auf Verunreinigungen mit Proteinen und Salzen geprüft. Es erfolgten weitere Messungen bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und 230nm (Absorptionsmaximum von Salzen). Der Quotient aus der Absorption bei 260nm und 280nm sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen, der 260/230-Quotient hingegen bei >2,0.

Als Blindprobe wurde 1μl desselben RNA/DNA-freien Wassers genutzt, in dem die RNA zuvor gelöst wurde.

### 3.5. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die gewonnene RNA wurde mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zunächst wurden dafür 1,5μg RNA mit 2,25μl eines 20μM Oligo (dT) Primers (18xT, Fermentas life sciences, St. Leon Roth, Deutschland) vermischt und das Volumen mit Aqua ad injectabilia auf 18,75μl ergänzt. Der Oligo (dT) Primer ist ein Oligonukleotid, welches komplementär an der terminalen Poly-A-Sequenz der mRNA bindet. Die Reverse Transkriptase benötigt diese Markierung als Startpunkt für die cDNA Synthese.

Zur Aufschmelzung der Sekundärstrukturen wurden daraufhin die Proben mittels Thermocycler (Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) für 10 Minuten auf 70°C erhitzt und folgend für die Hybridisierung der Primer langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden die Proben mit je 11,03μl Master Mix (**Tab.1**) versetzt und für eine Stunde bei 42°C (Temperaturoptimum der reversen Transkriptase) inkubiert. Nach abgeschlossener Synthese erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen der Ansätze auf 90°C für fünf Minuten. Nach langsamem Abkühlen auf 4°C konnte die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Material	Volumen
5x First Stand Buffer*	6 $\mu$ l
0,1M Dithiothreitol (DTT)*	3 $\mu$ l
10mM dNTP*	1,5 $\mu$ l
Superscript (reverse Transkriptase, 200U/ $\mu$ l)*	0,53 $\mu$ l

\* Invitrogen

**Tab.1:** *Zusammensetzung Master Mix*

### 3.6. Realtime quantitative PCR

Nach Umschreibung der mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) in komplementäre DNA erfolgte die Quantifizierung dieser mittels Realtime quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR). Dieses Verfahren ermöglicht die Echtzeitmessung der in den Proben enthaltenen DNA über Fluoreszenz und den Einsatz genspezifischer Primer (für HO-1, NQO-1 und NRF-2, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland, **Tab.2**). Um weiterhin vor oder während der qRT-PCR entstandene Fehlerquellen auszugleichen (z.B. Unterschiede bezüglich der DNA-Ausgangsmenge, Varianz während der reversen Transkription) ist der Einsatz eines internen Standards nötig. Als interner Standard (Housekeeping gene) wurde Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Hprt, Applied Biosystems, **Tab.2**) gewählt. Dieses Enzym des Purin Stoffwechsels unterliegt einem konstanten Expressionsniveau und keiner aktiven Regulation in NHEK.

Primer	Artikelnummer
Hprt	Hs 01003267_m1
HO-1	Hs 01110250_m1
NQO-1	Hs 00168547_m1
NRF-2	Hs 00232352_m1

**Tab.2:** *Verwendete Primer*



Die qRT-PCR erfolgte in 20µl-Ansätzen mit einem *7300 Real-time PCR System* (Applied Biosystems). Dazu wurden 5µl cDNA, 4µl Aqua ad injectabilia, 1µl des jeweiligen Primers und 10µl TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) pro Loch auf eine 96-Loch-Platte (Sarstedt) pipettiert. Neben dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat), dUTPs (Desoxyuridintriphosphat), einer passiven Referenz und einem Buffer sind in dem TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix sowohl AmpliTaqGold<sup>®</sup>, Taq-Sonden, als auch AmpErase<sup>®</sup>-Uracil-N-Glycosylase (UNG) enthalten.

Die quantitative RT-PCR verläuft in drei Abschnitten. In der ersten Phase werden die Proben für zwei Minuten auf 50°C erhitzt. Hier liegt das Temperaturoptimum der AmpErase<sup>®</sup>-UNG. Diese verhindert die Amplifikation unerwünschter DNA-Abschnitte. Zur Denaturierung der DNA folgt daraufhin die Erhitzung auf 95°C für weitere 10 Minuten mit anschließender Abkühlung auf 60°C für eine Minute. In dieser Phase hybridisieren die Primer und die Taq-Sonden mit den DNA Strängen. Die Amplifikation durch die DNA-Polymerase beginnt. Es schließen sich 45 Wiederholungszyklen an, in denen immer wieder für 10 Sekunden auf 95°C erhitzt und anschließend wieder auf 60°C abgekühlt wird. In diesem Abschnitt, der sogenannten exponentiellen Phase, erfolgt die Fluoreszenzdetektion.

Basis der Fluoreszenz stellen die Taq-Sonden dar. Sie enthalten an ihrem 5'-Ende einen Reporter (Carboxyfluorescein=FAM<sup>™</sup>), dessen Fluoreszenzeigenschaft jedoch durch die räumliche Nähe zum Quencher (Tetramethylrhodamin=TAMRA<sup>™</sup>) am 3'-Ende der Sonde inhibiert wird. Sobald die hitzestabile DNA-Polymerase (AmpliTaQGold<sup>®</sup>) bei der Amplifikation der DNA auf die Sonde trifft, wird ihre 5'3'-Exonukleasefunktion aktiv und der Reporter wird von der Sonde abgetrennt. Dieser beginnt zu fluoreszieren, was dann durch das Gerät detektiert werden kann.

Diese Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zu den entstehenden PCR-Produkten.

### 3.6.1. Daten Analyse

Während der ersten Zyklen der qRT-PCR werden als Zeichen einer Grundfluoreszenz der Sonden ausschließlich „Rauschsignale“ detektiert. Mit zunehmender Amplifikation nimmt die Fluoreszenz jedoch kontinuierlich zu, bis sie dann schließlich signifikant über jene Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Zeitpunkt wird als Cycle-Threshold bzw. Ct-Wert bezeichnet und stellt den Schnittpunkt der Fluoreszenzkurve mit dem Schwellenwert (Threshold: 0,2) dar.

Je mehr DNA dementsprechend zu Beginn der qRT-PCR in den Proben vorhanden ist, desto früher wird dieser Schnittpunkt erreicht. Ein Ct-Wert > 33 gilt als unspezifisch und nicht auswertbar.

Zur Normierung wurden die Zielgene auf ein nicht reguliertes „Housekeeping gene“ bezogen (Hprt), um mögliche Unterschiede zwischen den Proben zu reduzieren. Hierfür wurde der Ct-Wert der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase von jenem des Zielgenes subtrahiert.

$$\Delta Ct = \text{Zielgen Ct} - \text{Hprt Ct}$$

Zur weiteren Fehlerreduktion erfolgte dann die Bestimmung des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes (relative Expression) durch Subtraktion des zuvor ermittelten  $\Delta Ct$  der Kontroll- Probe (ohne Stimulation) von dem  $\Delta Ct$  einer behandelten Probe.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ stimulierte Probe} - \Delta Ct \text{ der Kontrolle}$$

Anschließend wurde der errechnete  $\Delta\Delta Ct$  zur Bestimmung der n-fachen exponentiellen Amplifikation in folgende Formel eingesetzt:

$$n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.7. Durchflusszytometrie

#### 3.7.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren zur Quantifizierung, Charakterisierung und Sortierung von Zellpopulationen mittels optischer Charakteristika. Auf der Grundlage einer Antigen-Antikörperreaktion und Kopplung des Komplexes an einen fluoreszierenden Antikörper, können Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften detektiert werden.

Die Zellen werden hierbei einzeln und in hoher Geschwindigkeit über eine Messkapillare durch einen gebündelten Laserstrahl gesaugt (= hydrodynamische Fokussierung). Passiert die Zelle den Laserstrahl, so kommt es zum einen zu einer Beugung (Forward-Scatter), als auch

zu einer Brechung (Sideward-Scatter) des Lichts in einem definierten Winkel. Hierbei korreliert das Ausmaß der Lichtbeugung mit der Zellgröße, jenes der Lichtbrechung mit der Granularität der Zelle.

### 3.7.2. Fixation und Permeabilisierung

NHEK wurden wie in 2.1. beschrieben kultiviert, anschließend trypsinisiert und in Zellkulturschalen (100x20mm, Sarstedt) ausgesetzt. Pro Schale wurden  $8 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Nach weiteren zwei Tagen zeigte sich ein semikonfluenter Zellrasen. Es erfolgte die Stimulation über 24 Stunden mit  $10 \mu\text{M}$  DMF (in 0,01% DMSO gelöst). Als Kontrollen dienten ausschließlich mit 0,01% DMSO (gelöst in PBS) versetzte NHEK.

Nach 24 Stunden wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 0,04% Trypsin/ 0,03% EDTA und TNS unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst. Nach Zentrifugation (1000U/min,  $24^\circ\text{C}$ , 5Min.) konnten die Zellen in 1ml PBS aufgenommen werden.

Anschließend wurden  $10^6$  Zellen pro Vertiefung in eine 96-Loch-U-Bottom-Platte (Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland) gegeben. Nach Zentrifugation (1000 U/min,  $4^\circ\text{C}$ , 5Min.), erfolgte die Zugabe von 200 $\mu\text{l}$  Fixations-/Permeabilisationslösung (Foxp3 Staining Set, eBiosciences, Frankfurt, Deutschland). Die Platte wurde folgend für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  gekühlt und anschließend erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und jede Probe mit 200 $\mu\text{l}$  Permeabilisierungs-Buffer (Foxp3 Staining Set, eBiosciences; 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation erfolgte dann die Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  Permeabilisierungs-Buffer, sowie 1 $\mu\text{l}$  des NRF-2 Antikörpers (Maus IgG [Immunglobulin] 2b, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), 1 $\mu\text{l}$  eines NQO-1 Antikörpers (Maus IgG1, US Biological, Massachusetts, USA) und 1 $\mu\text{l}$  des HO-1 Antikörpers (Maus IgG1, Stress Marq Biosciences Inc., Victoria, USA). Die Ansätze wurden ausreichend resuspendiert und die Platte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

Am Folgetag wurde die 96-Loch-U-bottom-Platte zentrifugiert, die Überstände abgenommen und erneut 200 $\mu\text{l}$  des Permeabilisierungs-Buffers pro Vertiefung hinzugegeben. Nach Resuspendierung, Zentrifugation und Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  des Permeabilisierungs-Buffers, wurde 1 $\mu\text{l}$  des fluoreszierenden Antikörpers (Ziege-F(ab)<sub>2</sub> anti-Maus IgG FITC [Fluorescein Isothiocyanate], Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) in jeden Ansatz pipettiert. Zur Analyse der Spezifität des fluoreszierenden Antikörpers wurden desweiteren sowohl für HO-1

und NQO-1, als auch für NRF-2 Isotyp-Kontrollen angesetzt. Anstelle des Ziege- F(ab)<sub>2</sub> anti-Maus IgG FITC wurden hier Antikörper eingesetzt, welche der Subklasse des 1. Antikörpers entsprachen. So erfolgte Zugabe von 1µl IgG1 FITC (Imagenex Corporation, Port Coquitlam, Kanada) zu den HO-1- und NQO-1-Ansätzen. Zu den NRF-2 Versuchen wurden jeweils 1µl IgG2b FITC (US Biological) pipettiert. Die Platte wurde folgend bei 4°C über 30 Minuten gelagert.

Nach Ablauf der Zeit konnte die Platte zentrifugiert (1000U/min, 4°C, 5Min.), die Überstände abgesaugt und 100µl MACS (Magnetic Cell Separation)-Puffer (0,5% BSA<sup>2</sup> [Bovines Serumalbumin] + 2mM EDTA, in PBS verdünnt) zu jedem Ansatz hinzugefügt werden.

### **3.7.3. Analyse der Zellsuspension**

Die Analyse der einzelnen Zellsuspensionen erfolgte an einem FC500-CXP FACS-Analyzer (Beckman Coulter).

### **3.8. Nachweis von NRF-2 mittels indirekter Immunfluoreszenz**

NHEK wurden wie in 2.1. kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte in einer LabTek<sup>®</sup>- Platte (Nalge nunc International, New York, USA). Pro Kammer wurden 2x10<sup>4</sup> Zellen mit 200µl Medium eingesetzt. Am Folgetag erfolgte die Inkubation der Keratinozyten mit 10µM DMF (gelöst in 0,01% DMSO) über 24 Stunden. Als Kontrollen dienten NHEK, die ausschließlich mit 0,01% DMSO (gelöst in PBS) inkubiert wurden, sowie Keratinozyten ohne jegliche Stimulation.

Nach 24 Stunden wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und jede Kammer mit 200µl PBS zweimalig gespült. Nach Zugabe von 100µl 4%iges Paraformaldehyd (verdünnt in PBS, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zur Fixierung der Keratinozyten, wurde die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert.

Folgend wurde jede Kammer dreimalig mit 200µl PBS gespült und zur Permeabilisierung der Zellen 200µl 0,5%iges Triton X-100 (verdünnt mit PBS, Invitrogen) hinzugegeben.

Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur, wurde das 0,5%ige Triton mit einer Pipette abgenommen, jede Kammer wiederholt mit 200µl PBS gespült und mit 200µl 3%iges BSA (verdünnt in PBS, Sigma Aldrich Chemie) versetzt. Das BSA verblieb 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Platte. Nach Zugabe des primären Antikörpers NRF-2 (IgG2b Maus,

R&D Systems, 1:200 verdünnt mit 1%iges BSA<sup>2</sup>), wurden die Kammern über Nacht bei 4°C gelagert.

Am Folgetag wurden die Kammern der LabTek<sup>®</sup>- Platte dreimalig mit je 200µl PBS und 0,05%iges PBS-Tween gewaschen. Zum Anfärben des primären Antigen-Antikörper-Komplexes wurde ein Sekundärantikörper derselben Spezies (Alexa Fluor 488, Ziege anti-Maus IgG; Invitrogen) genutzt, um Kreuzreaktionen zu verhindern. Zur Darstellung der Zellkerne, erfolgte der Einsatz von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma Aldrich Chemie). Dieser fluoreszierende Farbstoff bindet ausschließlich an DNA und führt somit zu keiner Färbung des Zytoplasmas. Hierfür wurden DAPI und der Zweitantikörper 1:1000 mit 1%iges BSA<sup>2</sup> verdünnt und anschließend 100µl der Lösung auf jeden Ansatz pipettiert.

Die Kammern wurden folgend lichtgeschützt bei Raumtemperatur für eine Stunde gelagert und anschließend wiederholt mit 200µl PBS gespült.

Nach Entfernung der Kammerwände von der Platte erfolgte die Eindeckung der Ansätze auf dem Objektträger mittels Fluoreszenz Mounting Medium (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland). Zur Aushärtung des Mediums wurde die LabTek<sup>®</sup>- Platte anschließend bei 4°C lichtgeschützt über Nacht gelagert.

Am Folgetag erfolgte die Auswertung an einem Zeiss Axiovert 40 CFL-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der quantitativen Realtime-PCR

Die Analyse der mittels quantitativer Realtime-PCR erhobenen Daten erfolgte, wie in 2.6.1. beschrieben, über Microsoft Office Excel 2007. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigen Zwei-Stichproben-t-Test ermittelt.

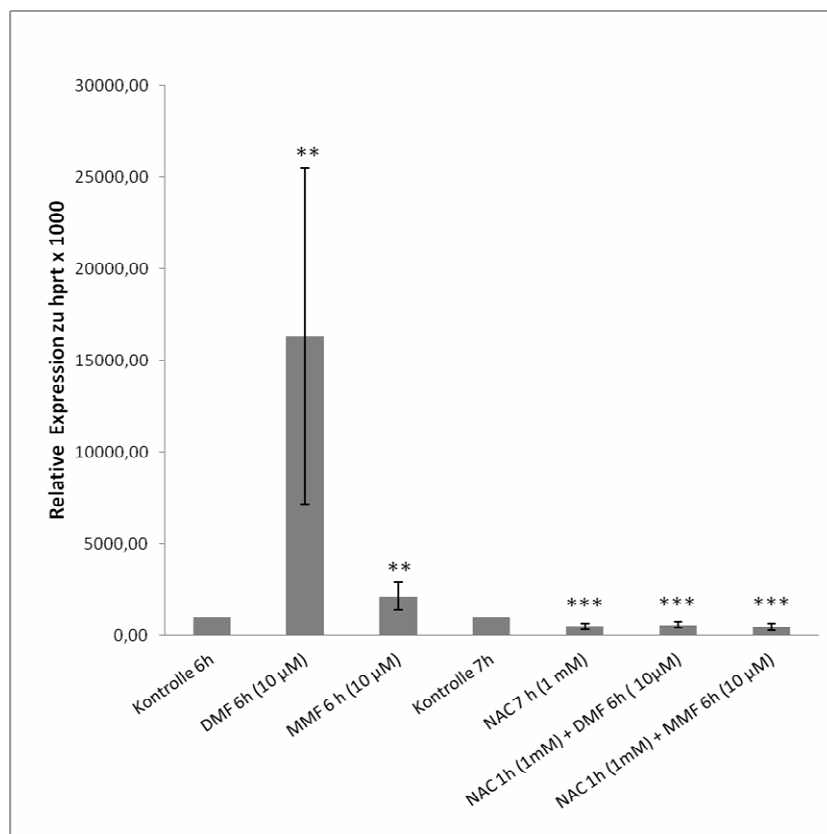
#### 4.1.1. Untersuchung der Transkripte unter 10 $\mu$ M DMF und MMF, sowie 1mM NAC in normalen humanen Keratinozyten

Um den Einfluss von Fumarsäureestern auf die mRNA-Expression von HO-1 (**Abb.2**), NQO-1 (**Abb.3**) und NRF-2 (**Abb.4**) zu untersuchen, wurden NHEK mit je 10 $\mu$ M DMF und MMF über 6 Stunden behandelt. Als Kontrollen dienten Ansätze, denen 0,01% DMSO (Lösungsmittel von DMF und MMF) zugesetzt wurde.

Unter der Annahme, dass die Zugabe von DMF initial zu einer intrazellulären GSH-Depletion führt und damit das Entstehen eines oxidativen Milieus induziert, erfolgte in weiteren Versuchen eine Vorbehandlung mit 1mM N-Acetylcystein über 1 Stunde. Hintergrund ist die Überlegung, dass in NAC enthaltenes Cystein zur GSH-Produktion genutzt und der durch DMF induzierte oxidative Stress durch den Überschuss an Glutathion abgefangen werden könnte.

##### 4.1.1.1. Analyse der HO-1 Transkripte

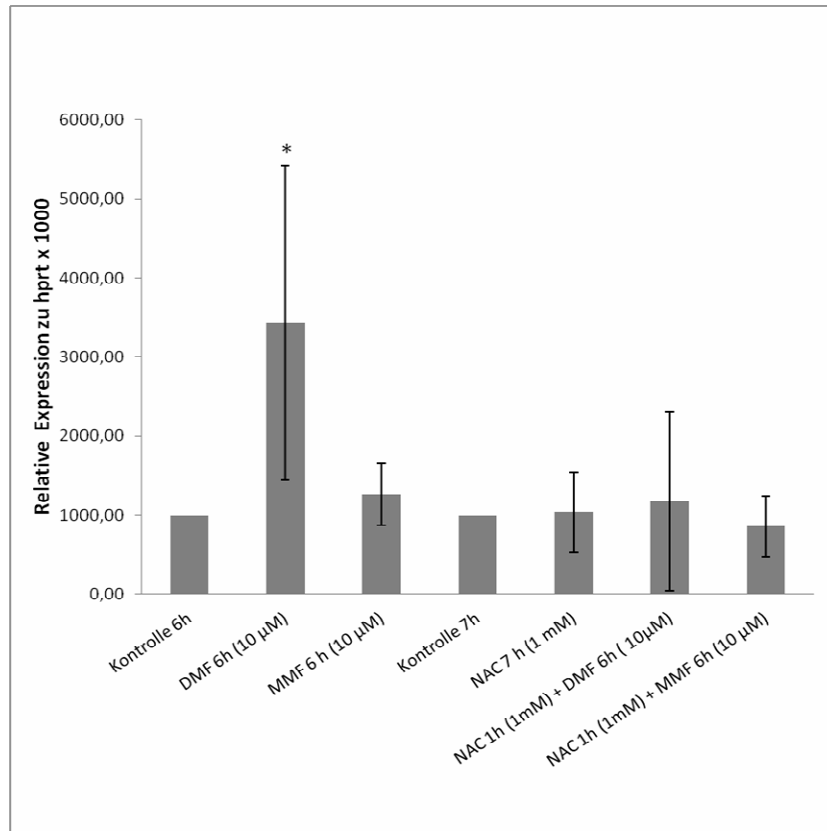
Die relative Expression von HO-1 zeigte unter DMF eine deutliche Steigerung um mehr als das 16fache zur Kontrolle. Auch unter Inkubation mit MMF konnte eine Erhöhung des Ausgangswertes verzeichnet werden, welche sich mit einer Verdopplung zum Kontrollwert allerdings weniger ausgeprägt darstellte. Sowohl unter alleiniger Stimulation mit NAC, als auch in jenen Versuchen mit N-Acetylcystein Vorbehandlung über 1 Stunde und anschließender Zugabe von DMF und MMF, zeigte sich eine Reduktion um mehr als die Hälfte zu den 6h-Kontrollwert (**Abb.2**).



**Abb. 2:** *Relative Expression des Phase-2-Proteins HO-1*  
*Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Versuchen*  
*\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$*

#### 4.1.1.2. Ermittlung der NQO-1 Expression

Die Analyse der NQO-1 mRNA ergab ebenfalls eine Steigerung der Expression unter Inkubation mit 10µM DMF. Monomethylfumarat zeigte weder unter alleiniger Inkubation, noch unter Vorbehandlung mit NAC einen Effekt. Die Kombination aus NAC und DMF zeigte keine deutliche Verminderung der NQO-1 Expression. (**Abb.3**).

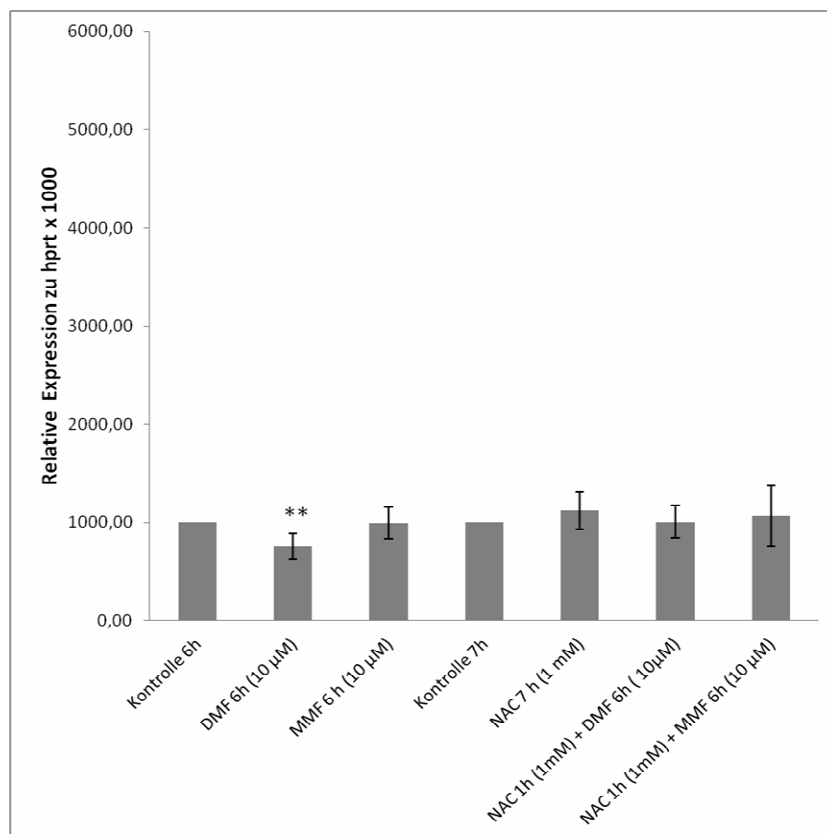


**Abb.3:** *Relative Expression des Phase-2-Proteins NQO-1*  
*Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 5 Versuchen*  
*\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$*

#### 4.1.1.3. Untersuchung der NRF-2 Expression

Im Gegensatz zur steigenden HO-1 und NQO-1 Expression unter DMF konnte in Bezug auf den Transkriptionsfaktor NRF-2 ein signifikanter Abfall verzeichnet werden. Auch in dieser Untersuchung zeigte MMF keinen Einfluss auf die Ausbildung der NRF-2-mRNA. Ebenso waren die einstündige Vorbehandlung mit NAC und die alleinige Stimulation mit N-Acetylcystein ohne signifikanten Einfluss auf die Genexpression (**Abb.4**).





**Abb.4:** *Relative Expression des Transkriptionsfaktors NRF-2*  
*Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 5$  Versuchen*  
*\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$*

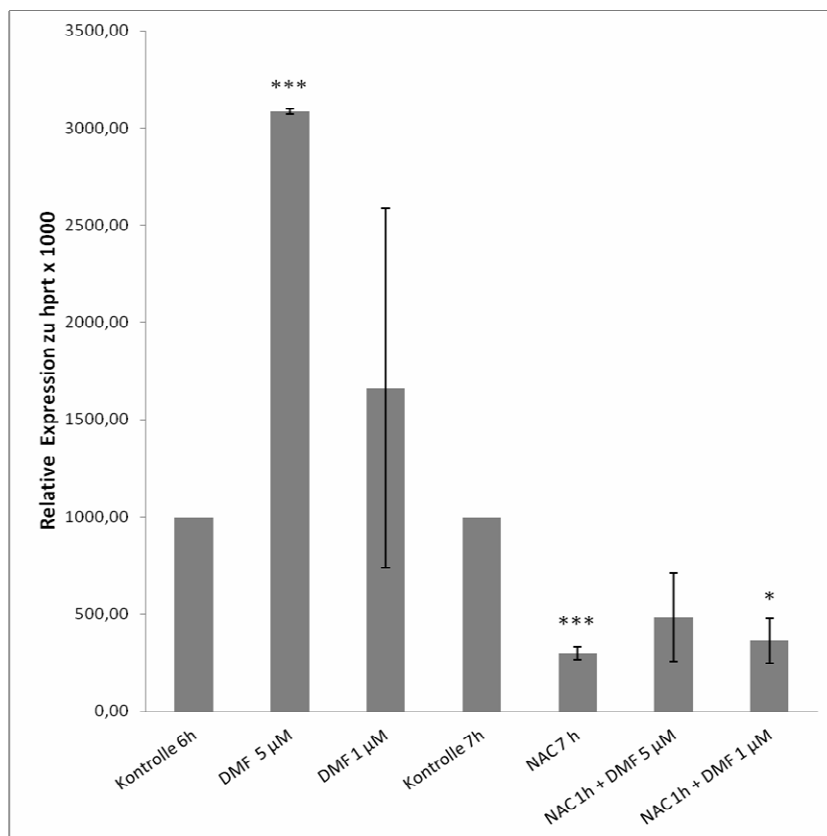
#### 4.1.2. Untersuchung der Transkripte unter 1µM und 5µM DMF, und MMF, sowie 1mM NAC in normalen humanen Keratinozyten

Da sich in den vorhergehenden Versuchen eine Wirkung von 10µM DMF auf die Expression von HO-1, NQO-1 und NRF-2 nachweisen ließ, galt ein weiterer Ansatz der Analyse dieser Gene unter 5µM und 1µM DMF.

##### 4.1.2.1. Analyse der HO-1 Transkripte

Auch unter Inkubation mit 5µM DMF konnte eine deutliche Induktion der HO-1-Transkripte um mehr als das Dreifache detektiert werden. 1µM DMF führte im Mittel zwar ebenfalls zu einer Steigerung, aufgrund der hohen Standardabweichung konnte diese Beobachtung jedoch keine Signifikanz erlangen.

Nach siebenstündiger Inkubation mit NAC präsentierte sich eine ausgeprägte Reduktion der HO-1-Expression. Interessanterweise wurde eine signifikante Verminderung der HO-1-mRNA unter NAC und 1 $\mu$ M DMF, nicht jedoch unter NAC zusammen mit 5 $\mu$ M DMF beobachtet. (**Abb.5**)



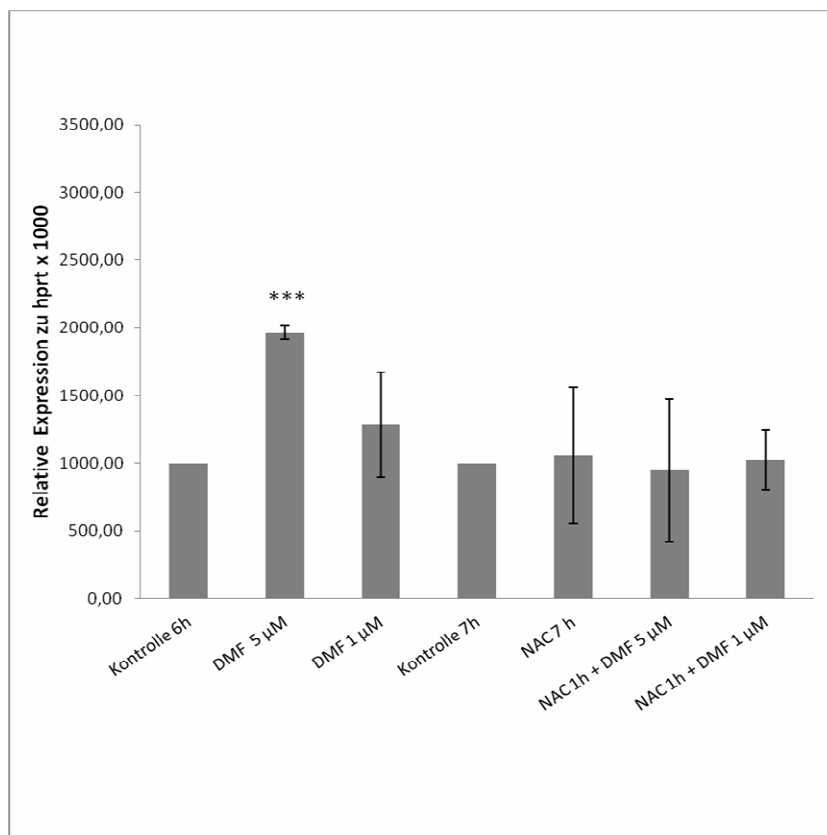
**Abb.5:** *Relative Expression des Phase-2-Proteins HO-1*  
Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  Versuchen

\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.1.2.2. Ermittlung der NQO-1 Expression

Die Ansätze zur Untersuchung der NQO-1 Expression zeigten ausschließlich unter DMF eine signifikante Änderung. Im Gegensatz zur Stimulation mit 1 $\mu$ M DMF, konnte unter 5 $\mu$ M DMF eine deutliche Steigerung der NQO-1 Transkripte um das Zweifache des Kontrollwertes verzeichnet werden. Die Werte unter alleiniger Inkubation mit N-Acetylcystein, sowie die

Ansätze mit zusätzlicher Gabe von 1 $\mu$ M und 5 $\mu$ M DMF nach einer Stunde blieben unverändert. (**Abb.6**)

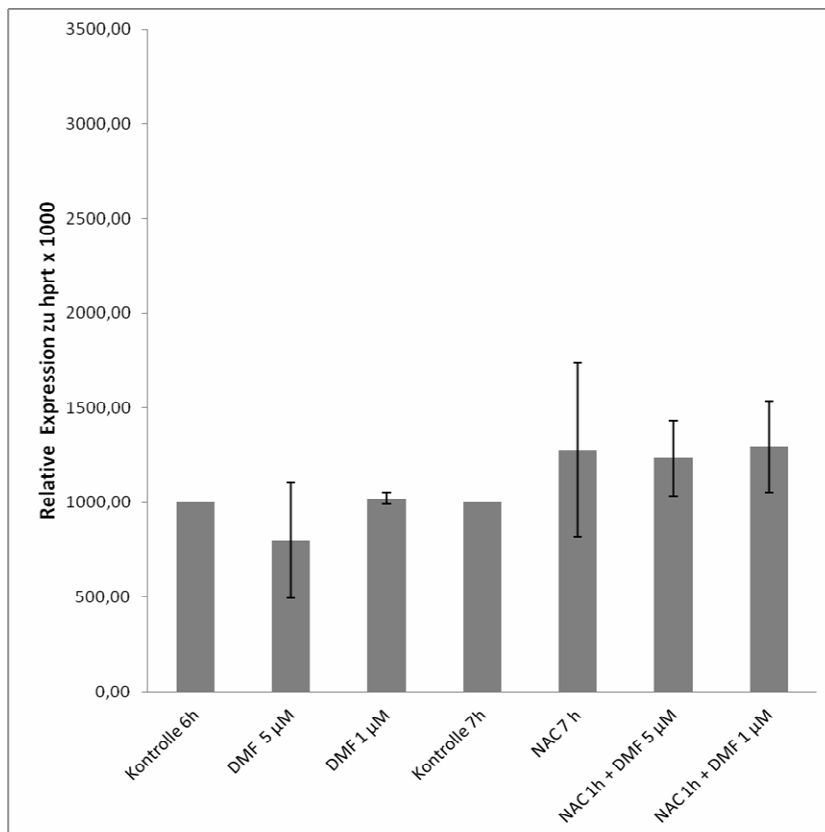


**Abb.6:** *Relative Expression des Phase-2-Proteins NQO-1*  
*Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 2 Versuchen*  
*\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$*

#### 4.1.2.3. Untersuchung der NRF-2 Expression

Bezüglich der relativen NRF-2-Expression konnten in keinem Ansatz eine signifikante Änderung der Transkripte im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden. Zwar zeigte sich unter 5 $\mu$ M DMF eine Reduktion der NRF-2-mRNA im Mittel, eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Werte, die unter 1 $\mu$ M DMF detektiert wurden, unterschieden sich nicht wesentlich von dem Mittelwert der 6h-Kontrolle. Die ausschließliche Behandlung mit N-Acetylcystein war ohne Einfluss auf die Transkription. Unter einstündiger Vorbehandlung mit

NAC und weiterer Stimulation mit Dimethylfumarat konnte sowohl unter  $1\mu\text{M}$  als auch  $5\mu\text{M}$  DMF keine ausgeprägte Veränderung bestimmt werden. (**Abb.7**)



**Abb.7:** *Relative Expression des Transkriptionsfaktors NRF-2*

*Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  Versuchen*

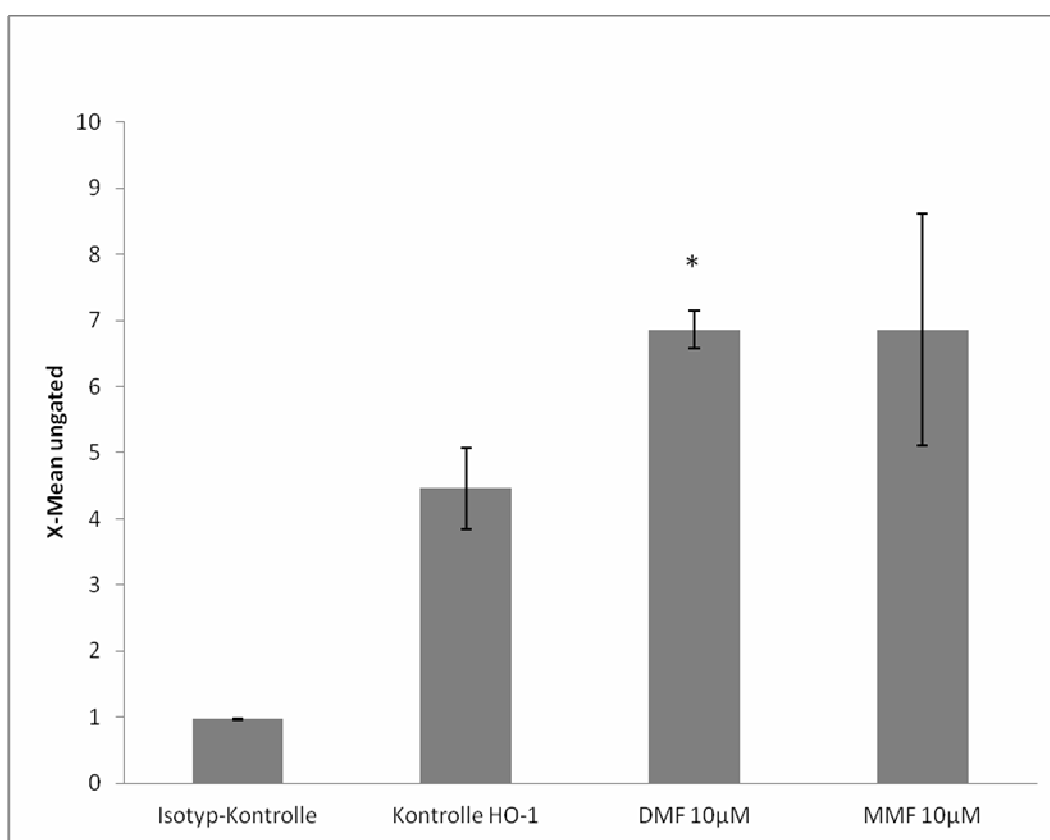
*\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$*

#### 4.2. Proteinnachweis mittels Durchflusszytometrie

Zur weiteren Verifizierung der qRT-PCR-Ergebnisse bezüglich der Expression von HO-1, NQO-1 und NRF-2, erfolgte der Nachweis der Moleküle auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrollen dienten Zellen, denen ausschließlich 0,01% DMSO (gelöst in PBS) zugesetzt wurde. Die Auswertung der Daten wurde mit einer Microsoft Excel Software durchgeführt. Die Ermittlung der p-Werte erfolgte mittels zweiseitigen 2-Stichproben-t-Test.

### 4.2.1. Analyse von HO-1

Da sich in der qRT-PCR bezüglich der HO-1 Transkription neben der Stimulation mit 10 $\mu$ M DMF auch einen signifikanter Anstieg unter 10 $\mu$ M MMF zeigte, erfolgte zur Bestätigung dieser Ergebnisse auch für die Durchflusszytometrie eine Stimulation mit 10 $\mu$ M MMF zur Beurteilung der HO-1 Produktion. NHEK wurden über 24 Stunden sowohl mit 10 $\mu$ M DMF als auch mit 10 $\mu$ M MMF stimuliert. Unter Inkubation mit 10 $\mu$ M DMF konnte eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz verzeichnet werden. Die Stimulation mit 10 $\mu$ M MMF zeigte eine Erhöhung von HO-1 im Mittel. Eine Signifikanz wurde nicht erlangt. (**Abb.8**)



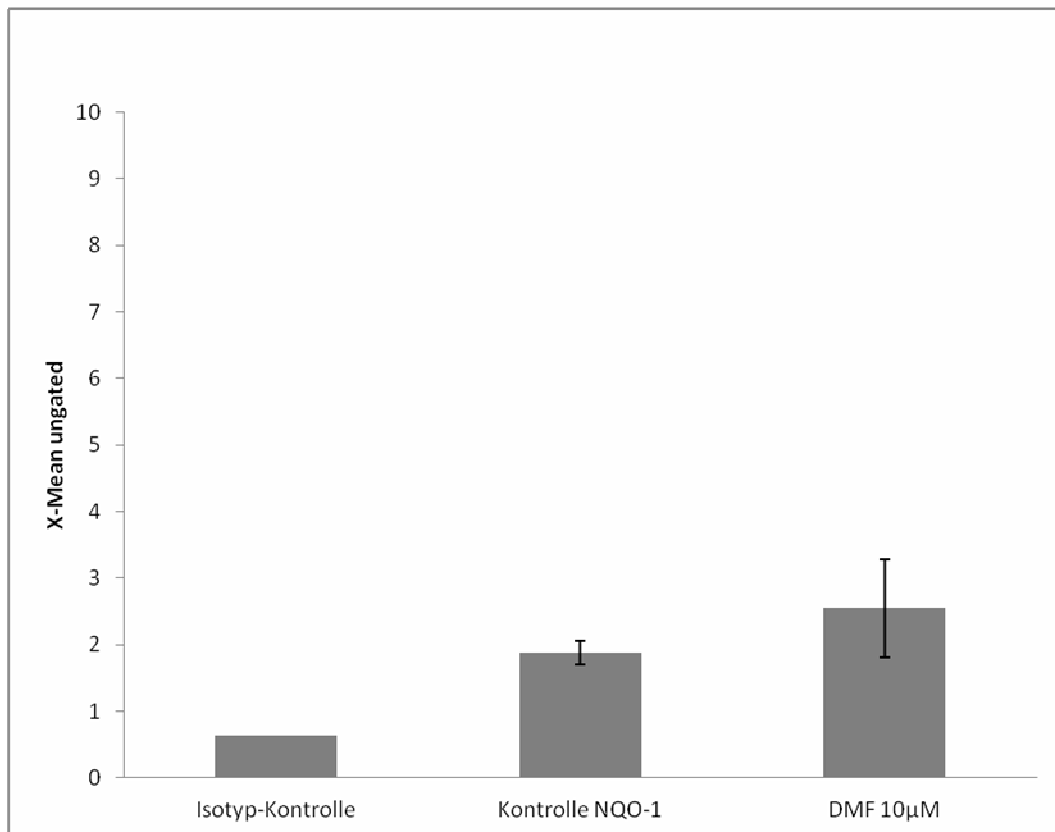
**Abb.8:** *HO-1- Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie*

*Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 2 Versuchen*

*\* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\*p < 0,001*

#### 4.2.2. Untersuchung der NQO-1 Fluoreszenz

Es erfolgte die Inkubation von Normalen humanen Keratinozyten mit 10 $\mu$ M DMF. Zwar konnte im Vergleich zur Kontrolle eine tendenzielle Erhöhung der NQO-1 Signalstärke gezeigt werden, eine Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden. (**Abb.9**)



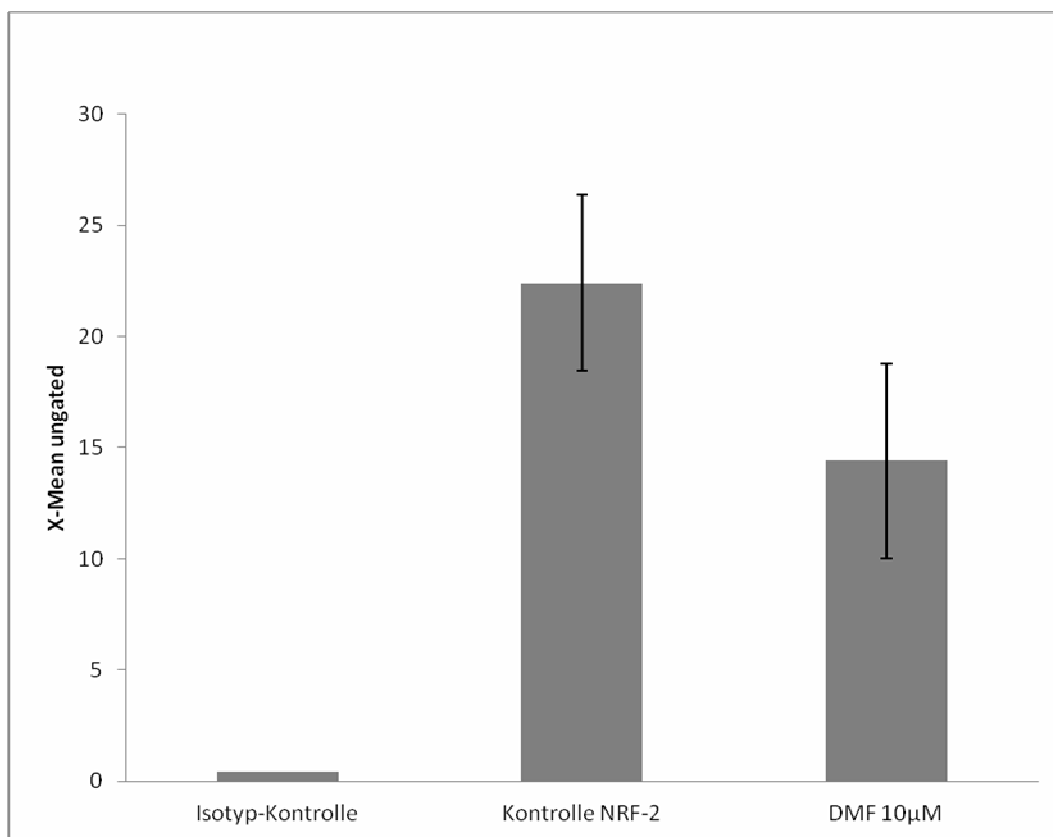
**Abb. 9:** *NQO-1- Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie*

*Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 2 Versuchen*

*\* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\*p < 0,001*

#### 4.2.3. Analyse von NRF-2

Während bezüglich der Phase-2-Proteine HO-1 und NQO-1 eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie verzeichnet werden konnte, stellte sich die Signalstärke von NRF-2 gegensätzlich dazu dar. Die Signalstärke des Transkriptionsfaktors nahm nach Inkubation mit 10 $\mu$ M DMF im Mittel deutlich ab. (**Abb.10**)



**Abb. 10:** *NRF-2- Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie*

*Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  Versuchen*

*\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$*

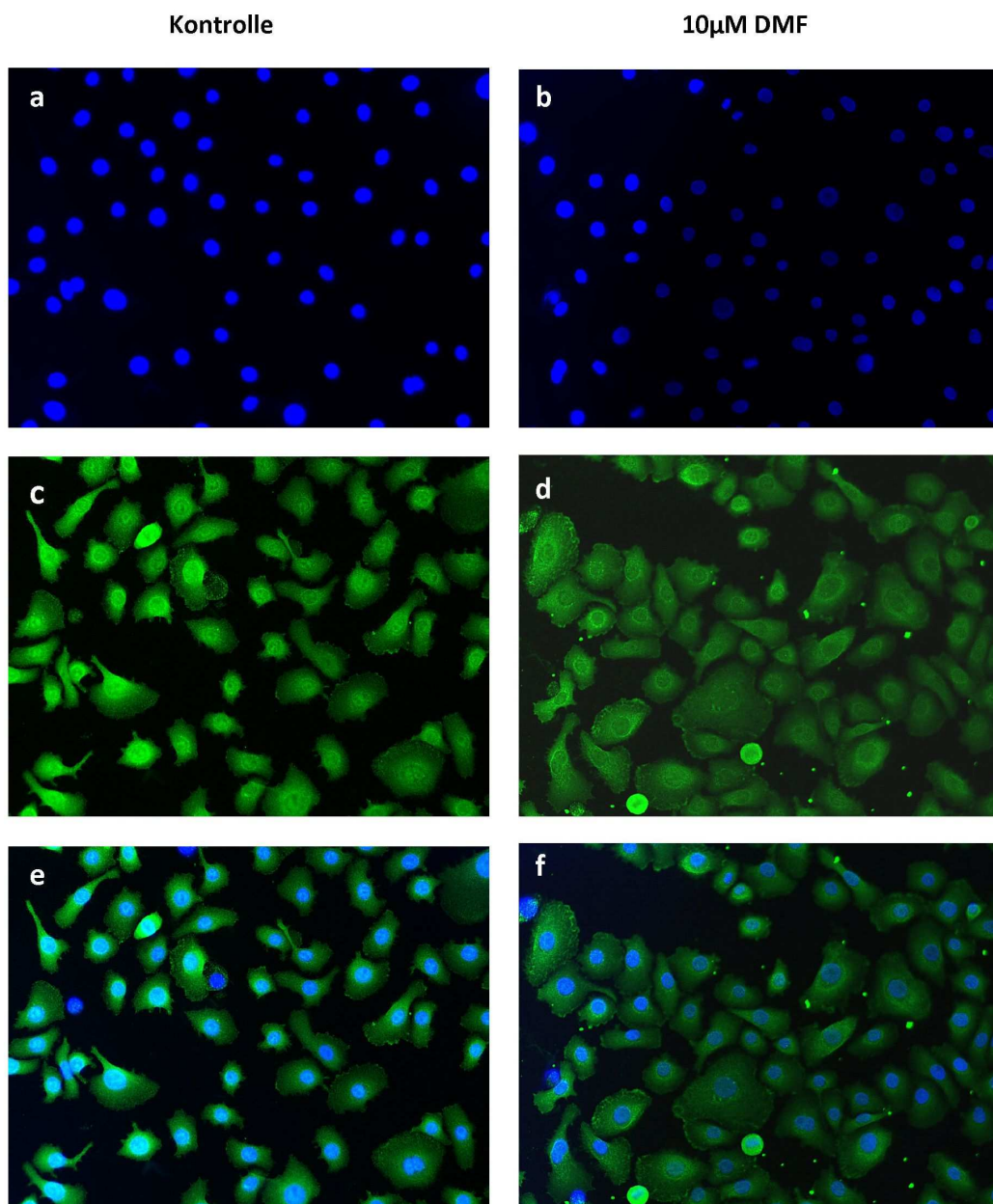
### 4.3. Analyse des Transkriptionsfaktors NRF-2 mittels indirekter Immunfluoreszenz

NRF-2 transloziert nach Dissoziation von KEAP-1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Basierend auf den Ergebnissen, dass DMF scheinbar zu einer Reduktion der NRF-2 Expression führt und möglicherweise ausschließlich der zytoplasmatische Abfall dessen verzeichnet wurde, erfolgte die Detektion von NRF-2 mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Dazu wurden NHEK wie in 3.9. beschrieben inkubiert und aufgearbeitet. Für die Färbung der Zellkerne wurde DAPI (blau fluoreszierend, **Abb.11a,b**) genutzt. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Fluorochrom (Alexa 488, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) zur Darstellung von NRF-2 emittiert grünes Licht. (**Abb.11c,d**) Zur

vergleichenden Auswertung erfolgte die Projektion der beiden Färbungen aufeinander. (Abb.11e,f)

Bereits in den Kontrollproben konnte eine deutliche und ubiquitär in der Zelle vorkommende Fluoreszenz verzeichnet werden. Insbesondere zytoplasmatisch und zellkernzirkumferent zeigte sich dabei eine erhöhte Lichtemission. Verglichen mit den Ergebnissen nach Inkubation mit 10 $\mu$ M DMF, konnte kaum eine Änderung der Signalstärke sowohl um den Zellkern als auch intranukleär verzeichnet werden.



**Abb.11:** Indirekte Immunfluoreszenz, 20fache Vergrößerung



## 5. Diskussion

Fumarsäureester in Form des Medikamentes Fumaderm<sup>®</sup> ist die häufigste verwendete Therapie für Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Psoriasis in Deutschland. Durch eine Reihe wissenschaftlicher Untersuchungen in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass DMF der pharmakologisch aktive Bestandteil dieses Medikamentes darstellt. Auch wenn kontrollierte Studien mit einem DMF- Monopräparat für die Indikation Psoriasis bislang nicht publiziert sind, konnte mit Panaclar<sup>®</sup> (einziger Wirkstoff DMF) eine erfolgreiche Phase-II-Studie in der Indikation Multiple Sklerose veröffentlicht werden. Im Vergleich zu Placebo zeigte sich sowohl ein Rückgang der Symptome, als auch eine Reduktion der sklerotischen Herde in der Magnetresonanztomografie. [69]

Bezüglich des Wirkmechanismus von DMF befinden sich derzeit eine Vielzahl an möglichen Signalkaskaden in der Diskussion. Sicher scheint, dass DMF nach intrazellulärer Aufnahme ein Addukt mit Glutathion bildet. Es folgt eine Verschiebung des Redoxpotentials der Zelle. Diese Veränderung in Richtung eines oxidativ geprägten Milieus ermöglicht die Aktivierung verschiedener Signalwege. [51,52]. So wird unter anderem angenommen, dass sich NRF-2 aufgrund des induzierten oxidativen Stresses von dem inhibitorischen Molekül KEAP-1 löst, in den Nucleus transloziert und zur Produktion der Phase-2-Proteine HO-1 und NQO-1 führt. [55-59] Die vorliegende Dissertation untersuchte diesen Signalweg an humanen Keratinozyten.

### Einfluss von DMF auf die Expression von NRF-2, HO-1 und NQO-1

Es wurde angenommen, dass DMF aufgrund seiner hohen Lipophilie schnell in den Körperkreislauf gelangt und die ihm zugeschriebenen Wirkungen in peripheren Geweben wie der Haut, entfalten kann. [52]

Um die Wirkung von Dimethylfumarat auf Keratinozyten zu untersuchen, wurden NHEK über 6 Stunden mit 10 $\mu$ M DMF inkubiert. Dabei konnte eine mehr als dreifache Erhöhung der NQO-1-mRNA Expression nachgewiesen werden (**Abb.3**). Die HO-1-mRNA Expression zeigte im Vergleich zur Kontrolle sogar eine 16fache Induktion (**Abb.2**). Während Forschungsergebnisse der letzten Jahre unter anderem in Zellen der Lunge [70] und des retinalen Pigmentepithels [71] einen Zusammenhang zwischen der Expression von HO-1 und NQO-1 zu NRF-2 herstellen konnten, bestätigte sich diese Annahme nicht in Keratinozyten.

Es zeigte sich eine deutliche Minderung der NRF-2-mRNA Expression in den hier durchgeführten Experimenten (**Abb.4**).

Zur Frage, ob DMF auch in niedrigeren Konzentrationen Effekte auf die Expression der Phase-2-Proteine ausübt, wurde ein weiterer Versuchsansatz mit Stimulation von NHEK mit 1 $\mu$ M und 5 $\mu$ M DMF durchgeführt.

Unter Inkubation mit 5 $\mu$ M DMF konnte zwar auch in diesem Ansatz eine Induktion der HO-1-mRNA nachgewiesen werden, diese stellte sich jedoch mit einer Erhöhung um das dreifache zum Ausgangswert weniger ausgeprägt als unter 10 $\mu$ M DMF dar (**Abb.5**). Auch Lehmann et al. konnten in Studien an PBMC (Peripheral blood mononuclear cell), Monozyten und T-Zellen eine deutliche Dosisabhängigkeit bei der Expression von HO-1 durch DMF zeigen. Eine Dosiserhöhung führte konsekutiv zu einer vermehrten Bildung von HO-1. [42]

Während unter 5 $\mu$ M DMF neben einer vermehrten HO-1- auch eine erhöhte Expression der NQO-1-mRNA dargestellt werden konnte, stellte 1 $\mu$ M DMF eine scheinbar zu niedrige Dosierung dar und zeigte weder auf die Produktion von HO-1 noch auf NQO-1 signifikante Effekte (**Abb.5-6**). Die NRF-2-mRNA Expression betrachtend, konnte im Gegensatz zu 10 $\mu$ M DMF unter 5 $\mu$ M Dimethylfumarat keine signifikante Reduktion der Expression detektiert werden. (**Abb.7**).

Nach Inkubation von NHEK über 24 Stunden mit 10 $\mu$ M DMF konnte mittels Durchflusszytometrie auch auf Proteinebene ein signifikanter Anstieg der HO-1 Expression verzeichnet werden (**Abb.8**). Bezüglich der Produktion von NQO-1 und NRF-2 konnte zwar keine Signifikanz, jedoch eine tendenzielle Entwicklung der Expression gesehen werden: NQO-1 wurde vermehrt gebildet, während sich die durchschnittliche NRF-2 Expression im Vergleich zum Kontrollwert verringerte (**Abb.9-10**).

Der Anstieg der HO-1- und NQO-1-mRNA unter DMF ohne Steigerung der NRF-2 Expression könnte sich unter anderem über Einwirken anderer Transkriptionsfaktoren erklären, die zur Induktion der genannten Phase-2-Proteine führen.

Wie in 1.4. beschrieben, wird neben NRF-2 auch die Modulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zu den Mechanismen der Kompensation von oxidativem Stress gezählt. Da NF $\kappa$ B sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen zugewiesen wird und beide Phase-2-Proteine zu den Zielgenen des Transkriptionsfaktors zählen, stand NF $\kappa$ B in den letzten Jahren im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. [72] Die publizierten Ergebnisse zeigen jedoch eine

Hemmung von NF $\kappa$ B durch DMF mit konsekutiver Hemmung der Translokation in den Zellkern, sodass eine darüber induzierte Expression von HO-1 und NQO-1 unwahrscheinlich scheint. [33]

Interessanterweise klassifizierten Providence et al. 2002 in vitro bei Untersuchungen an Keratinozyten den Transkriptionsfaktor USF-1 (Upstream transcription factor-1) als wichtigen Regulator bei der Wundheilung. [73] Als Transkriptionsfaktor bindet USF-1 an einer spezifischen Gen-Sequenz, die E-Box (CACGTG). Die E-Box befindet sich unter anderem in der proximalen Promoter-Region des HO-1-Gens. [74] Hock et al. bestätigten 2004 einen Zusammenhang zwischen USF-1 und HO-1 in humanen renalen Epithelzellen. HK-2 (Human kidney-2) Zellen wurden sowohl mit Hämin, als auch mit Cadmium-Chlorid über 4 Stunden stimuliert. Unspezifische Bindungen anderer Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Leucin-Zipper-Proteine (c-Myc, Mad, Mdx) an den HO-1 Promotor wurden zuvor mittels EMSA (Electrophoretic mobility-shift assay) ausgeschlossen. Die Untersuchungen bestätigten unter anderem mittels Northern-Blot und Immunfluoreszenz die spezifische Bindung von USF-1 an die E-Box von HO-1 mit konsekutiv folgender Expressionserhöhung dieses Phase-2-Proteins. [75]

Obwohl bisher keine Untersuchungen zu der Wirkung von USF-1 auf die Expression von NQO-1 vorliegen, könnte USF-1 zukünftig in den Mittelpunkt weiterer Untersuchungen rücken, da dieser Transkriptionsfaktor auch an der Regulation des Lipid- und Glukosestoffwechsel beteiligt ist. So konnte USF-1 interessanterweise auch eine Rolle bei der Ausbildung von Diabetes mellitus Typ II und dem metabolischen Syndrom zugeschrieben werden- zwei typischen mit der Psoriasis assoziierten Erkrankungen. [74,76] Bislang liegen noch keine Daten zu der Wirkung von Fumarsäureestern auf USF-1 vor.

Unstimmig bleiben jedoch die Ergebnisse der scheinbar fehlenden Assoziation von NQO-1 und NRF-2 in den vorliegenden Untersuchungen. Erst kürzlich analysierten Piao et al. diese Fragestellung auch in Keratinozyten. Als Stimulus diente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid). Zwar konnte dabei eine Unabhängigkeit zwischen HO-1 und NRF-2 nachgewiesen, gleichzeitig jedoch aber auch eine Assoziation des Transkriptionsfaktors NRF-2 zu NQO-1 belegt werden. [77]

### **Analyse des Transkriptionsfaktors NRF-2 mittels indirekter Immunfluoreszenz**

NRF-2 transloziert nach Dissoziation von KEAP-1 in den Zellkern. [57] Basierend auf der Annahme, dass in den vorliegenden Untersuchungen möglicherweise ausschließlich der zytoplasmatische Abfall von NRF-2 nach Translokation in den Nucleus nachgewiesen und intranukleäres nicht erfasst wurde, erfolgte ein Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die Analyse erfolgte unter Inkubation von NHEK mit 10µM DMF über 24 Stunden verglichen zu einer unstimulierten Kontrolle. Dabei konnte eine sowohl extra- als auch intranukleäre Fluoreszenz mit deutlicher zellkernzirkumferenter Signalakkumulation nachgewiesen werden. Stimulation mit DMF scheint keinen Einfluss auf die Ausprägung der Fluoreszenz zu besitzen: weder eine Anhebung noch eine Abschwächung des NRF-2-Signales ließen sich erkennen. (**Abb.11**)

In Anbetracht der ansteigenden Expression der HO-1- und NQO-1-mRNA unter DMF (siehe 4.1.1.1. und 4.1.1.2.), stellt sich desweiteren die Frage, inwiefern dem NRF-2 verwandte Proteine als Induktoren für diese Phase-2-Proteine dienen könnten.

NRF-2 zählt zu der Gruppe der „Cap-n-Collar“-Familie. Weitere Moleküle dieser Gruppe sind BACH (BRCA [Breast cancer] 1-associated CT Helicase)-1, BACH-2, NRF-1 und NRF-3. Braun et al. führten 2002 einer Studie zur Rolle von NRF-2 bei der Wundheilung durch. Nach dem Ergebnis, dass eine NRF-2-Defizienz bei Mäusen nicht konsekutiv zu einem Absinken von HO-1 in den Keratinozyten führte, analysierte die Arbeitsgruppe mögliche kompensatorische Mechanismen durch NRF-1 und NRF-3. Während NRF-1 kaum Einfluss auf die Expression hatte, konnte eine Erhöhung von NRF-3 mit gleichzeitiger Erhöhung der HO-1-, als auch GST-Ya (Glutathion-S-Transferase Ya)-mRNA in NRF-2 knockout Mäusen gesehen werden. Die Zugabe der NRF-3-inhibitorischen Substanz Menadion neutralisierte diesen Effekt. Jedoch wurden in dieser Arbeit nur GST-Ya und HO-1 untersucht. NRF-2 und NQO-1 wurden nicht näher betrachtet. [78] Fraglich bleibt nicht nur der endgültige Einfluss von NRF-3, sondern auch inwieweit dieser Transkriptionsfaktor bei Ineffizienz von NRF-2 dessen Funktionen kompensatorisch übernimmt.

### **Einfluss von MMF auf die Expression von NRF-2, HO-1 und NQO-1**

Die Stimulation von NHEK mit 10µM MMF über 6 Stunden zeigte weder auf die Expression von NRF-2 (**Abb.4**), noch auf NQO-1 (**Abb.3**) einen Einfluss. Obwohl Untersuchungen an

PBMC keinen Effekt von MMF auf die Expression von HO-1 belegen [48], konnte in den vorliegenden Ansätzen an Keratinozyten allerdings eine signifikante Induktion der HO-1-mRNA unter MMF verzeichnet werden, die sich verglichen zur Kontrolle zweimal so hoch darstellte (**Abb.2**).

Zur Bestätigung des Ergebnisses erfolgte die Analyse des HO-1-Proteins mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden NHEK mit 10 $\mu$ M MMF über 24 Stunden inkubiert. Zwar konnte dabei im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter, jedoch ein deutlicher Anstieg von HO-1 im Mittel verzeichnet werden und bestätigte damit die in der quantitativen RT-PCR gewonnenen Ergebnisse (**Abb.8**).

Die vermehrte Expression von HO-1-mRNA ohne Anstieg von NRF-2 impliziert die mögliche Aktivierung eines anderen Signalweges durch MMF, welcher ausschließlich HO-1, nicht aber NQO-1 induziert. Wie bereits erwähnt unterstützten Piao et al. die Hypothese einer NRF-2- unabhängigen Expression von HO-1 in Experimenten an Keratinozyten. Zwar zeigte sich dabei eine Induktion von HO-1 bei gleichzeitig hohen Werten für NRF-2, nach NRF-2 knockdown resultierte jedoch keine Minderung der HO-1 Produktion, sodass auf einen Einfluss anderer Signalwege geschlossen werden kann. [77] Studien der Forschungsgruppe Yeligar et al. untersuchten dahingehend den vorrangig durch Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ). Dabei wurden Ethanol-geschädigte hepatische Kupffer-Zellen aus Ratten verwendet. Nachdem eine Erhöhung von HO-1, NQO-1 und HIF-1 $\alpha$  gezeigt werden konnte, erfolgte eine weiterführende Analyse mit NRF-2- defizienten Zellen. Dabei zeigten sich erhöhte Werte sowohl für HO-1 als auch für HIF-1 $\alpha$ . Die Expression von NQO-1 war hingegen vermindert. [79]

### **Stellenwert von NAC in der experimentellen Analyse**

Zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Gleichgewichtes stellt Glutathion einen essentiellen Bestandteil dar. GSH schützt die Zelle vor oxidativen Stress. Durch die freie Thiolgruppe ist GSH in der Lage als Elektronendonator zu dienen. Auf diese Weise fungiert Glutathion nicht nur als Entgiftungsmolekül, sondern ist auch in der Lage ROS zu eliminieren. Werden zwei GSH-Moleküle durch die Abgabe von Elektronen oxidiert, entsteht durch Bildung einer Disulfidbrücke GSSG (Glutathion-Disulfid). Je höher das intrazelluläre GSH Vorkommen ist, desto größer ist der Schutz der Zelle vor oxidativen Stress. [80]

Es konnte gezeigt werden, dass DMF durch die Bindung an freies, intrazelluläres Glutathion zu einer GSH-Depletion führt und folgend antioxidative Signalwege aktiviert werden, die im weiteren Verlauf den oxidativen Stress kompensieren. [51,52] Zu diesen scheint nach aktueller Studienlage auch der NRF-2-Signalweg zu zählen, welcher nach Aktivierung zu der Expression von HO-1 und NQO-1 führen soll. [58,59]

Zur Bestätigung dieser Hypothese erfolgte die Stimulation von NHEK mit 1mM N-Acetylcystein. Cystein ist ein essentieller Baustein bei der Bildung von Glutathion. Nach Bindung von Glutaminsäure an Cystein durch GCL (Glutamat-Cysteinligase), erfolgt die Kopplung an Glycin mittels Glutathion-Synthetase. [80] Unter der Annahme, dass NAC für die intrazelluläre De-novo-Synthese von GSH genutzt wird und den durch DMF induzierten oxidativen Stress kompensieren könnte, erfolgte die Zugabe von NAC eine Stunde bevor die Fumarsäureester (je 10 $\mu$ M, 5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M DMF, sowie 10 $\mu$ M MMF) über 6 Stunden hinzu gegeben wurden. Neben unstimulierten Zellen dienten NHEK unter alleiniger Stimulation mit 1mM NAC über 7 Stunden als zusätzliche Referenz.

Hypothetisch wäre eine Reduktion der NRF-2-mRNA und bei bestehender GSH-Abhängigkeit, auch der Phase-2-Proteine HO-1 und NQO-1 erwarten. Aufgrund des zusätzlichen GSH-Schutzes, wäre eine Induktion der Proteine erst nach Verbrauch des Glutathions erkennbar, da in der Folge ein oxidativ geprägtes Milieu entsteht und andere antioxidative Mechanismen benötigt werden würden.

Die Ergebnisse stellten sich hingegen eher kontrovers zu dieser Annahme dar. Bei Betrachtung der Daten im Vergleich zu der stimulierten Expression durch DMF konnte zwar eine tendenzielle Reduktion der NQO-1-mRNA beobachtet werden, im Vergleich zur Kontrolle stellt sich jedoch nur die Expression von HO-1 unter 10 $\mu$ M und 1 $\mu$ M DMF signifikant reduziert dar. Dieses Resultat war auch mit 10 $\mu$ M MMF reproduzierbar. NRF-2 schien, unabhängig von der Art der Stimulation, unbeeinflusst. Auch Scannevin et al. belegten in einer aktuellen Studie an Zellen des zentralen Nervensystems eine Beeinflussung des intrazellulären GSH-Levels nicht nur durch DMF, sondern auch durch MMF. [81]

Die gewonnenen Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, zeigte sich ausschließlich in der qRT-PCR eine signifikante Minderung der NRF-2-mRNA Expression unter DMF, welche auf Proteinebene in der Durchflusszytometrie nicht signifikant reproduzierbar war.

Desweiteren legen die Resultate die Vermutung nahe, dass die gewählten Konzentrationen der jeweiligen Substanzen zu niedrig waren, um Effekte, die in Untersuchungen mit anderen Zellen beobachtet wurden, auch in Keratinozyten zu induzieren. Allerdings entsprach die Konzentration von MMF (10 $\mu$ M) jener, die auch im Plasma von Patienten nach Einnahme von Fumaderm<sup>®</sup> gemessen werden konnte.

So konnte zwar in der bereits genannten Studie von Scannevin et al. eine Assoziation von NRF-2 zu den Phase-2-Proteinen unter 10 $\mu$ M DMF hergestellt werden [81], in Anbetracht der geringen Toleranz von Zellen des ZNS gegenüber oxidativen Stress, ist eine schnelle Reaktion auf minimale Veränderungen des Redoxpotentials für deren Weiterbestehen essentiell. Jedoch liegen bisher noch keine vergleichbaren Untersuchungen bezüglich einer Wirkung von DMF auf NRF-2 an Keratinozyten vor.

Dass zukünftige Forschung bezüglich einer möglichen Hemmung des Transkriptionsfaktors NRF-2 bei Psoriasis durch Fumarsäureester weiterhin von großer Relevanz sein sollte, zeigt eine kürzlich publizierte Studie. Schäfer et al. erlangten dabei Erkenntnisse zu der Rolle von NRF-2 in Keratinozyten. Dessen Analysen basierten auf vergleichenden Untersuchungen zwischen NRF-2-transgenen Mäusen mit einem konstitutiv hohen NRF-2-Expression und Wildtyp-Mäusen. Dabei konnte sowohl histologisch, als auch mittels quantitativer RT-PCR und Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass eine erhöhte NRF-2 Konzentration überraschenderweise mit einer vermehrten Hyperparakeratose, Desquamation und Entzündungsreaktion der Haut einherging. Nach Stimulation der Wildtyp-Mäuse mit tert-Butylhydrochinon (tBHQ) oder Sulforaphan zeigten diese und die unstimulierten transgenen Mäuse eine vermehrte Expression spezifischer Hüllproteine wie beispielsweise Slpi (Secretory leukocyte peptidase inhibitor), Sprr2d (Small proline-rich protein 2D) und Sprr2h (Small proline-rich protein 2H). Auch konnte eine vermehrte Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  in den transgenen Mäusen nachgewiesen werden, sowie eine Erhöhung von dermalen CD3<sup>+</sup> T-Zellen und neutrophilen Granulozyten. [82] Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass DMF bei humanen Keratinozyten nicht wie bei anderen bisher untersuchten Zellen, zu einer Induktion

von NRF-2 führt, sondern die Effekte von DMF bei der Therapie der Psoriasis über eine Hemmung dieses Transkriptionsfaktors vermittelt werden könnten.

### **Zukünftiger Stellenwert von Fumarsäureestern in der Medizin**

Neben der Therapie der Psoriasis werden Fumarsäureester und hier vor allem DMF, auch in anderen medizinischen Bereichen zunehmend Bedeutung erlangen.

Verschiedene Untersuchungen belegen einen neuroprotektiven Charakter von DMF.

Ellrichmann et al. publizierten 2011 Ergebnisse einer Studie, bei der an Chorea Huntington erkrankte Mäuse einer DMF-Langzeittherapie unterzogen wurden. Dabei stellte sich sowohl eine verlängerte Überlebenszeit gegenüber der Placebogruppe heraus, als auch eine Minderung der Dyskinesie-Ausprägung. Histomorphologisch konnte eine verbesserte Erhaltung sowohl striataler, als auch kortikaler Neurone nachgewiesen werden. [83]

Auch Linker et al. untersuchten in Versuchen an Mäusen mit EAE (experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis), dem Korrelat der Multiplen Sklerose im Tiermodell, die Wirkung von DMF auf Zellen des zentralen Nervensystems. Dabei konnte eine Reduktion des Neuronenverlustes im Rückenmark, Kleinhirn, sowie Hirnstamm gesehen werden. [84]

Schilling et al. unterstützten diese Erkenntnis mit dem Nachweis einer deutlichen Reduktion der Makrophagen- und Mikroglia- Infiltration im ZNS von EAE-Mäusen. [85]

Basierend auf diesen Erkenntnissen, scheint Dimethylfumarat in Zukunft die Therapie der Multiplen Sklerose entscheidend zu beeinflussen. Das DMF enthaltene Medikament BG-12 (BG00012/FAG-201) befindet sich aktuell bereits in der Phase III der klinischen Prüfung. [86]. Die ersten kürzlich publizierten Ergebnisse belegen einen therapeutischen Effekt. Im Vergleich zu Placebo zeigte sich unter Behandlung mit BG-12 eine Reduktion sowohl der jährlichen Schubrate, als auch der Läsionen im MRT. [87,88]

Ferner zeigen Fallberichte positive Effekte unter Therapie mit Fumarsäureestern sowohl bei Patienten mit Alopecia areata [89], als auch bei Patienten mit kutaner Sarkoidose [90].

Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation, dass DMF zu einer Induktion von HO-1 und NQO-1 führt, erschließen sich noch weitere mögliche Einsatzgebiete.

Den antioxidativen Stellenwert von HO-1 unterstützend, bestätigen Forschungen bezüglich des Gilbert Syndroms. Diese Erkrankung geht mit einer erhöhten Konzentration des zirkulierenden Plasma-Bilirubins einher. Wie im Abschnitt 1.5. beschrieben, stellt Bilirubin



ein Endprodukt des durch HO-1 induzierten Häm-Abbaus dar und ist ein potentes Antioxidans. Inoguchi et al. konnten in einer Studie bei Patienten mit Diabetes mellitus und Gilbert Syndrom eine verringerte Prävalenz für das Auftreten vaskulärer Komplikationen, wie der Retinopathie, verglichen zu Patienten mit Diabetes ohne Gilbert Syndrom, nachweisen. Auch zeigten sich die Entzündungsmarker und Parameter für oxidativen Stress bei diesen Patienten reduziert. [91]

Clark et al. diskutierten nach Untersuchungen an Ratten einen möglichen kardioprotektiven Einfluss von HO-1 auf die postischämische Myokardfunktion. Nach Behandlung der Tiere mit Hämin, konnte in Assoziation mit einer Erhöhung von HO-1 in den Geweben, eine deutliche Verbesserung der Myokardfunktion verzeichnet werden. [92] Andere Studien verweisen sogar auf eine vorbeugende Wirkung von HO-1 gegenüber Herz-Transplantatabstoßungen. [93]

NQO-1 wird auch als ein möglich zukünftiges Zielgen bei der Therapie von Karzinomen betrachtet. Untersuchungen zeigen, eine erhöhte Sensitivität von Tumorzellen auf Mitomycin C bei gleichzeitiger Erhöhung der Expression von NQO-1 ohne die Toxizität dieses Wirkstoffes zu vergrößern. [94] Mitomycin C ist ein zytotoxisches Antibiotikum. Zu den zahlreichen Einsatzgebieten zählen u.a. Magen-, Lungen-, Pankreas- und Blasenkarzinome. [95]

## 6. Zusammenfassung

Die Psoriasis ist eine chronische entzündliche Erkrankung der Haut mit einer multifaktoriellen Genese, bei der vor allem immunologische Mechanismen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen. Das klinische Bild setzt sich aus epidermaler Akanthose und Parakeratose, sowie einem entzündlichen Infiltrat, vor allem neutrophiler Granulozyten, T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17- Zellen, zusammen. Zu den therapeutischen Möglichkeiten zählen sowohl die topische Behandlung der betroffenen Areale, als auch die systemische Therapie bei mittelschwerer bis schwerer Psoriasis. Neben den schon seit längerer Zeit etablierten Medikamenten wie Acitretin und Methotrexat, gehören auch Fumarsäureester (Fumaderm<sup>®</sup>) seit 1994 zu der konventionellen Behandlung in Deutschland. Fumaderm<sup>®</sup> beinhaltet sowohl Dimethylfumarat (DMF) als Hauptbestandteil, als auch verschiedene Monoethylfumarat-Salze. Studien der letzten Jahre belegen vor allem bei der Langzeittherapie der Psoriasis eine sehr gute Wirksamkeit mit gutem Nebenwirkungsprofil. Eine wichtige Eigenschaft der Fumarsäureester ist die Bindung an Glutathion und eine damit verbundene Beeinflussung des intrazellulären Redox-Gleichgewichtes.

Die vorliegende Dissertation widmet sich der Analyse des NF-E2-related factor-2 (NRF-2)-Signalweges. Induziert wird dieser Signalweg unter anderem durch oxidativen Stress, welcher durch DMF nach intrazellulärer Aufnahme über Bindung an Glutathion (GSH) und folgender GSH-Depletion in der Zelle, entstehen kann. Aufgrund des dadurch entstandenen Ungleichgewichtes zwischen GSH und Glutathion-Disulfid (GSSG), ändert sich das Redoxpotential der Zelle hin zu einem oxidativen Milieu. Der Transkriptionsfaktor NRF-2 disloziert von dessen inhibitorischen Molekül Kelch-like-ECH-associated protein 1 (KEAP-1), transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription der antioxidativ wirkenden Phase-2-Proteine Hämoxxygenase-1 (HO-1) und NADP(H):quinone-oxygenase-1 (NQO-1).

Bisherige Untersuchungen wurden an Zellen des retinalen Pigmentepithels und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durchgeführt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Keratinozyten zeigte sich unter 10µM DMF ein signifikanter Anstieg von HO-1 und NQO-1 in der quantitativen RT-PCR, jedoch eine Minderung der NRF-2 Expression, was auf eine NRF-2-unabhängige Produktion dieser Phase-2-Proteine schließen lässt. Ausgeschlossen wurde eine Detektion des zytoplasmatischen NRF-2 Abfalls bedingt durch die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern mittels indirekter

Immunfluoreszenz. Bezüglich der HO-1-mRNA Expression ließ sich eine Erhöhung unter 10 $\mu$ M MMF nachweisen.

HO-1 ist derzeit bereits als NRF-2-unabhängig gebildetes Protein bekannt. So konnte eine vermehrte Expression von HO-1 in Assoziation mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Ungeklärt bleibt hingegen die Tatsache, dass in den vorliegenden Ergebnissen auch ein NQO-1 Anstieg ohne NRF-2 Aktivierung gesehen wurde.

In dieser Dissertation wurden Konzentrationen der Fumarsäureester (MMF) gewählt, die im Plasma behandelter Patienten erreicht werden können.

Die Bestimmung von HO-1, NQO-1 und NRF-2 auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie zeigte nur eine signifikante Erhöhung der HO-1 Produktion unter DMF. Auch diese Daten bestätigen, dass bei Keratinozyten die Regulation der Expression von Phase-2-Proteinen offenbar von einander unabhängig ist. Die in dieser Arbeit weiterhin gezeigte Verminderung von NRF-2 durch Fumarsäureester könnte für die Therapie der Psoriasis mit diesen Substanzen eine wichtige Rolle spielen. In einem Maus-Modell führt die vermehrte Induktion von NRF-2 zu einer gesteigerten Hyperparakeratose, Desquamation und Entzündungsreaktion der Haut- typische morphologische Veränderungen der Psoriasis. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Hemmung von NRF-2 durch Fumarsäureester könnte daher die klinisch sichtbare Normalisierung von psoriatischen Läsionen unter Therapie erklären.

Weiterführende Untersuchungen sollten klären, wie die unterschiedliche Regulation von HO-1 Und NQO-1 in humanen Keratinozyten vermittelt wird und ob neben NRF-2 in diesen Zellen weitere Mitglieder der NRF-Familie eine Rolle spielen.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Mrowietz U, Reich K. Psoriasis—new insights into pathogenesis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:11-8.
- [2] Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Jr., Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol* 1999;41:401-7.
- [3] Reich K, Hüffmeier U, König IR, Lascorz J, Lohmann J, Wendler J, Traupe H, Mössner R, Reis A, Burkhardt H. TNF polymorphisms in psoriasis: association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF\*-857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis Rheum* 2007;56:2056-64.
- [4] Nast A, Boehncke WH, Mrowietz U, Ockenfels HM, Philipp S, Reich K, Rosenbach T, Sammain A, Schlaeger M, Sebastian M, Sterry W, Streit V, Augustin M, Erdmann R, Klaus J, Koza J, Müller S, Orzechowski HD, Rosumeck S, Schmidt-Ott G, Weberschock T, Rzyany B. S3-guidelines for the treatment of psoriasis vulgaris Update 2011. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011;2:S1-104.
- [5] Mrowietz U, Elder JT, Baker J. The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. *Arch Dermatol Res* 2006;289:309-19.
- [6] Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:982-6.
- [7] Rosenbach M, Hsu S, Korman NJ, Lebwohl MG, Young M, Bebo BF Jr, Van Voorhees AS; National Psoriasis Foundation Medical Board. Treatment of erythrodermic psoriasis: from the medical board of the National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:655-62.
- [8] Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, Franke J, Antoniou C, Arenberger P, Balieva F, Bylaite M, Correia O, Daudén E, Gisondi P, Iversen L, Kemény L, Lahfa M, Nijsten T, Rantanen T, Reich A, Rosenbach T, Segaert S, Smith C, Talme T, Volc-Platzer B, Yawalker N. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res* 2011;303:1-10.
- [9] Mrowietz U, Asadullah K. Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity. *Trends Mol Biol* 2005;11:43-8.
- [10] Rostami-Yazdi M, Mrowietz U. Fumaric acid esters. *Clin Dermatol* 2008;26:522-6.
- [11] Reich K, Thaci D, Mrowietz U, Kamps A, Neureither M, Luger T. Efficacy and safety of fumaric acid esters in the long-term treatment of psoriasis—a retrospective study (FUTURE). *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:603-11.

- 
- [12] Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, Kurd SK, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Strom BL. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol* 2007;143:1493–9.
- [13] Altmeyer P. et al. Antipsoriatic effect of fumaric acid derivatives. Results of a multicenter double-blind study in 100 patients. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:977-81.
- [14] Kemmet D, Symons JA, Colver GB, Duff GW. Serum-soluble interleukin 2 receptor in psoriasis: failure to reflect clinical improvement. *Acta Derm Venerol* 1990;70:264-6.
- [15] Zhou Q, Mrowietz U, Rostami-Yazdi M, Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radic Biol Med* 2009;47:891-905.
- [16] Lew W, Bowcock AM, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol* 2004;25:295-305.
- [17] Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gélinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382-7.
- [18] Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B as inducible transcriptional activator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* 1990;10:1281-6.
- [19] Mori N, Prager D. Transactivation of the interleukin-1alpha promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins. *Blood* 1996;15:3410-7.
- [20] Hiscott J, Marois J, Garoufalidis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G et al. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 1993;13:6231-40.
- [21] Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990;10:2327-34.
- [22] Kunsch C, Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 1993;13:6137-46.
- [23] Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990;171:35-47.
- [24] van de Stolpe A, Caldenhoven E, Stade BG, Koenderman L, Raaijmakers JA, Johnson JP, van der Saag PT. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone.

- Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* 1994;269:6185-92.
- [25] Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 1992;267:16323-9.
- [26] Whelan J, Ghera P, Hooft van Huijsduijnen R, Gray J, Chandra G, Talabot F, DeLamarter JF. An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2645-53.
- [27] Altmeyer P, Höxtermann S, Auer T. Verlaufbeobachtungen der Lymphozytensubpopulationen bei Psoriasis-Patienten unter oraler Therapie mit Fumaraten. *Akt Dermatol* 1996;22:272-7.
- [28] Höxtermann S, Nuchel C, Altmeyer P. Fumaric acid esters suppress peripheral CD4- and CD8-positive lymphocytes in psoriasis. *Dermatology* 1998;196:223-30.
- [29] Litjens NH, Nibbering PH, Barrois Aj, Zomerdijk TP, van Den Oudenrijn AC, Noz KC et al. Beneficial effects of fumarate therapy in psoriasis vulgaris patients coincide with downregulation of type 1 cytokines. *Br J Dermatol* 2003;148:444-51.
- [30] Nieboer C, de Hoop D, van Loenen AC, Langendijk PN, van Dijk E. Systemic therapy with fumaric acid derivatives: new possibilities in the treatment of psoriasis. *J Am Dermatol* 1989;20:601-8.
- [31] Nieboer C, de Hoop D, Langendijk PN, van Loenen AC, Gubbels J. Fumaric acid therapy in psoriasis: a double-blind comparison between fumaric acid compound therapy and monotherapy with dimethylfumaric acid ester. *Dermatologica* 1990;181:33-7.
- [32] Schweckendiek W. Treatment of psoriasis vulgaris. *Med Monatsschr* 1959;13:103-4.
- [33] Vandermeeren M, Janssen S, Boergers M, Geysen J. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:19-23.
- [34] Loewe R, Holnthoner W, Groger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002;168:4781-7.
- [35] Vandermeeren M et al. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$  B1, but not RelA in normal human dermal fibroblast cells. *J Invest Dermatol* 2001;116:124-30.
- [36] Treumer F, Zhu K, Gläser R, Mrowietz U. Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *J Invest Dermatol* 2003;121:1383-8.

- 
- [37] Stoof TJ, Flier J, Sampat D, Nieboer C, Tensen CP, Boorsma DM. The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Br J Dermatol* 2001;144:1114-20.
- [38] Ockenfels HM et al. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokine network. *Br J Dermatol* 1998;139:390-95.
- [39] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
- [40] Morel AS, Quaratino S, Douek DC, Londei M. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *Eur J Immunol* 1997;27:26-34.
- [41] Zhu K, Mrowietz U. Inhibition of dendritic cell differentiation by fumaric acid esters. *J Invest Dermatol* 2001;116:203-8.
- [42] Lehmann JC, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igeev FH, von Bonin A, Hennekes HH, Asadullah K, Docke WD. Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *J Invest Dermatol* 2007;127:835-45.
- [43] Litjens NH, Burggraaf J, van Strijen E, van Gulpen C, Mattie H, Schoemaker RC, et al. Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58:429-32.
- [44] Rostami-Yazdi M, Clement B, Schmidt TJ, Schinor D, Mrowietz U. Detection of metabolites of fumaric acid esters in human urine: implications for their mode of action. *J Invest Dermatol* 2009;129:231-4.
- [45] Asadullah K. et al. Influence of monomethylfumarate on monocytic cytokine formation-explanation for adverse and therapeutic effects in psoriasis? *Arch Dermatol Res* 1997;289:623-30.
- [46] de Jong, Bezemer AC, Zomerdijk TP, Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, Nibbering PH. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur J Immunol* 1996;26:2067-74.
- [47] Nibbering PH, Thio B, Bezemer AC, Beijersbergen RL, Zomerdijk TP. Intracellular signaling by binding sites for the antipsoriatic agent monomethylfumarate on human granulocytes. *Br J Dermatol* 1997; 137:65-75.
- [48] Lehmann M, Risch K, Nzze H, Lutz J, Heemann U, Volk HD et al. Fumaric acid esters are potent immunosuppressants: inhibition of acute and chronic rejection in rat kidney transplantation models by methyl hydrogen fumarate. *Arch Dermatol Res* 2002;294:399-404.

- [49] Litjens NH, Rademaker M, Ravensbergen B, Rea D, van der Plas MJ, Thio B, Walding A, van Dissel JT, Nibbering PH. Monomethylfumarate affects polarization of monocyte-derived dendritic cells resulting in down-regulated Th1 lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 2004;34:565-75.
- [50] Werdenberg D, Joshi R, Wolfram S, Merkle HP, Langguth P. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm Drug Dispos* 2003;24:259-73.
- [51] Nelson KC, Carlson JL, Newman ML, Sternberg P Jr, Jones DP, Kavanagh TJ, Diaz D, Cai J, Wu M. Effect of dietary inducer dimethylfumarate on glutathione in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1927-35.
- [52] Schmidt TJ, Ak M, Mrowietz U. Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-L-cysteine--preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters. *Bioorg Med Chem* 2007;15:333-42.
- [53] Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 2006;126:2565-75.
- [54] Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomed Pharmacother* 2007;61:412-22.
- [55] Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003;3:768-80.
- [56] Hayes JD, McMahon M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 2011;174:103-13.
- [57] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999;13:76-86.
- [58] Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1862-70.
- [59] Thimmulappa RK, Mai KH, Srsuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002;62:5196-203.
- [60] Ryter SW, Alam J, Choi Am. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86:583-650.



- [61] Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986;261:411-9.
- [62] Mc Faul SJ, McGrath JJ. Studies on the mechanism of carbon monoxide-induced vasodilatation in the isolated perfused rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;87:464-73.
- [63] Ewing JF, Haber SN, Maines MD. Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. *J Neurochem* 1992;58:1140-9.
- [64] Lee PJ, Alam J, Sylvester SL, Inamdar N, Otterbein L, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:556-68.
- [65] Ishii T, Itoh K, Sato H, Bannai S. Oxidative stress-inducible proteins in macrophages. *Free Radic Res* 1999;31:351-5.
- [66] Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* 2000;129:77-97.
- [67] Hanselmann C, Mauch C, Werner S. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis?. *Biochem J* 2001;353:459-66.
- [68] Wierinckx A, Brevé J, Mercier D, Schultzberg M, Drukarch B, Van Dam AM. Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. *J Neuroimmunol* 2005;132-43.
- [69] Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, Polman CH, Schmierer K, Yousry TA, Yang M, Eraksoy M, Meluzinova E, Rektor I, Dawson KT, Sandrock AW, O'Neill GN; BG-12 Phase IIb Study Investigators. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled IIb study. *Lancet* 2008;372(9648):1463-72.
- [70] Chan K, Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12731-6.
- [71] Johnson J, Maher P, Hanneken A. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2398-406.
- [72] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.

- [73] Providence KM, White LA, Tang J, Gonclaves J, Staiano-Coico L, Higgins PJ. Epithelial monolayer wounding stimulates binding of USF-1 to an E-box motif in the plasminogen activator inhibitor type 1 gene. *J Cell Sci* 2002;115:3767-77.
- [74] Meex SJ, van Vliet-Ostaptchouk JV, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Feskens EJ, Blaak EE, Wijmenga C, Hofker MH, Stehouver CD, de Bruin TW. Upstream transcription factor 1 (USF1) in risk of type 2 diabetes: association study in 2000 Dutch Caucasians. *Mol Genet Metab* 2008;94:352-5.
- [75] Hock TD, Nick HS, Agarwal A. Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2, bind to the human haem oxygenase-1 proximal promoter in vivo and regulate its transcription. *Biochem J* 2004;383:209-18.
- [76] Shouders CC, Naoumova RP. USF1 implicated in the aetiology of familial combined hyperlipidaemia and the metabolic syndrome. *Trends MolMed* 2004;10:362-5.
- [77] Piao MS, Park JJ, Choi JY, Lee DH, Yun SJ, Lee JB, Lee SC. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* 2012.
- [78] Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, Werner S. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* 2002;22:5492-505.
- [79] Yeligar SM, Machida K, Kalra VK. Ethanol-induced HO-1 and NQO-1 are differentially regulated by HIF-1alpha and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem* 2010;285:35359-73.
- [80] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30:42-59.
- [81] Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, Zeng W, Ryan S, Yamamoto M, Lukashev M, Rhodes KJ. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341:274-84.
- [82] Schäfer M, Farwanah H, Willrodt AH, Huebner AJ, Sandhoff K, Roop D, Hohl D, Bloch W, Werner S. Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med* 2012;doi:10.1002/emmm.201200219.
- [83] Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, Reick C, Arning L, Saft C, Gold R, Linker RA. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. *PLoS One* 2011;6:e16172.
- [84] Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, Zeng W, Hronowsky X, Buko A, Chollate S, Ellrichmann G, Brück W, Dawson K, Goelz S, Wiese S, Scannevin

- RH, Lukashev M, Gold R. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011;134:678-92.
- [85] Schilling S, Goelz S, Linker R, Luehder F, Gold R. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin Exp Immunol* 2006;145:101-7.
- [86] Linker RA, Lee DH, Stangel M, Gold R. Fumarates for the treatment of multiple sclerosis: potential mechanisms of action and clinical studies. *Expert Rev Neurother* 2008;8:1683-90.
- [87] Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or-A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT; DEFINE Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1098-107.
- [88] Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Vigiotta V, Dawson KT; CONFIRM Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1087-97.
- [89] Venten I, Hess N, Hirschmüller A, Altmeyer P, Brockmeyer N. Treatment of therapy-resistant Alopecia areata with fumaric acid esters. *Eur J Med Res* 2006;11:300-5.
- [90] Breuer K, Gutzmer R, Völker B, Kapp A, Werfel T. Therapy of noninfectious granulomatous skin diseases with fumaric acid esters. *Br J Dermatol* 2005;152:1290-5.
- [91] Inouchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayangi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. *JAMA* 2007;298:1398-400.
- [92] Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Gree CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H643-51.
- [93] Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998;4:1073-7.
- [94] Begleiter A, Leith MK, Thliveris JA, Digby T. Dietary induction of NQO1 increases the antitumor activity of mitomycin C in human colon tumours in vivo. *Br J Cancer* 2004;91:1624-31.
- [95] Verweij J, Pinedo HM. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1990;1:5-13.

**8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr.med. Schwarz, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie an der Universität Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz, welcher nicht nur das Thema der Dissertation vergab, sondern mir immer mit Rat und einem offenen Ohr zur Seite stand. Danke für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Großer Dank gilt Dr. Martin Rostami Yazdi, welcher mir immer half etwas Struktur in die Vielfalt der Anforderungen zu legen und mit fundiertem Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit gab.

Danke an Ramona Jurgeleit, die mich mit viel Geduld einarbeitete, mich mit konstruktiver Kritik unterstützte und mir stets bei Sorgen beistand.

Danken möchte ich Lisa Marie Philipp, welche mit wertvollen Ratschlägen und viel emotionaler Unterstützung für das Gelingen meiner Arbeit sorgte.

Frau Dr. Agatha Schwarz und ihrer Forschungsgruppe möchte ich meinen Dank für das große Engagement, die Bereitstellung der Geräte und aufopfernde Unterstützung bei der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz, ausdrücken.

Danke an die gesamte Arbeitsgruppe, für die herzliche Aufnahme, große Hilfsbereitschaft und die hervorragende Zusammenarbeit.

Neben den kollegialen Dankesbekundungen richtet sich mein besonderer Dank an meine Familie und Freunde für die Unterstützung und stetige Motivation in dieser Zeit.

**9. Lebenslauf**

Vor- und Nachname: Christina Dierks  
Geburtsdatum: 30.03.1987  
Geburtsort: Neu Kaliß in Mecklenburg Vorpommern  
Eltern: Beatrix Dierks, geb. Schmielewski  
Gero Dierks

**Schulbildung:**

1993-1999 Gijssels van Lier Grundschule, Lenzen  
1999-2006 Marie Curie Gymnasium, Wittenberge  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**Studium:**

10/2006 Beginn Studium der Humanmedizin an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
08/2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Beruflicher Werdegang:**

Seit 01/2013 St. Josefs Krankenhaus Potsdam,  
Klinik für Innere Medizin, Assistenzärztin