

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 BEKANNTEN PROVOKATIONSFAKTOREN DER PSORIASIS
AUF DIE EXPRESSION UND SEKRETION VON INTERLEUKIN-18 IN PRIMÄREN
HUMANEN KERATINOZYTEN**

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

vorgelegt von
Michael Robert Jaskolski
aus Bydgoszcz / Polen

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. Alexa Klettner
- Tag der mündlichen Prüfung: Kiel, den 12. April 2019
- Zum Druck genehmigt:

gez.:

Für meine Eltern

1. Einleitung	1
1.1. Psoriasis.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Ätiologie.....	2
1.1.3. Pathogenese.....	5
1.1.4. Klinische Formen der Psoriasis.....	6
1.2. Interleukin-18.....	7
1.3. Lithiumsalze.....	11
1.4. Flagellin.....	13
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	17
3.1. Kultivierung humaner Keratinozyten.....	17
3.2. Stimulation der NHEK.....	17
3.2.1. Zeitabhängige Stimulation mit Lithium Chlorid und Flagellin.....	17
3.2.2. Konzentrationsabhängige Stimulation mit Lithium Chlorid.....	18
3.3. RNA-Isolierung.....	18
3.4. RNA-Quantifizierung.....	19
3.5. cDNA-Synthese.....	19
3.6. Real Time Quantitative PCR.....	20
3.6.1. Datenauswertung.....	22
3.7. ELISA.....	23
3.7.1. Datenauswertung.....	24
3.8. Statistische Auswertung.....	24
4. Ergebnisse	26
4.1. Analyse der zeitabhängigen Stimulation mit Lithium Chlorid & Flagellin...26	
4.1.1. PCR.....	26
4.2. Analyse der konzentrationsabhängigen Stimulation mit Lithium Chlorid...28	
4.2.1. PCR.....	28
4.2.2. ELISA.....	29

5. Diskussion.....	30
5.1. Einfluss von Flagellin auf die Expression von IL-18.....	30
5.2. Einfluss von Lithium Chlorid auf die Expression & Sekretion von IL-18...31	
6. Zusammenfassung.....	34
7. Literaturverzeichnis.....	36
8. Anhang.....	49
9. Danksagung.....	52

95%-CI	Konfidenzintervall von 95%
AMP	Antimikrobielle Peptide
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain
ATP	Adenosintriphosphat
CARD	Caspase recruitment domain containing protein
CD	Cluster of differentiation
CLA	Kutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen
Ct-Wert	Cycle threshold
Cp-Wert	Crossing point
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GKS- 3 β	Glykogen-Kinase-Synthase 3 β
HLA	Human leukocyte antigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish peroxidase
IMID	Immune-mediated inflammatory diseases
IFN $\alpha/\beta/\gamma$	Interferon- α /- β /- γ
IKK	I κ B kinases
IL	Interleukin
IL-18BP	IL-18 binding protein
IL-18R	IL-18 Rezeptor
IL-18R α/β	IL-18 Rezeptor- α /- β
IRAK	IL-1R-associated kinases
Li ⁺	Lithium-Ionen
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat

LL-37	Cathelicidin LL-37
MHC-II	MHC-Klasse-II-Proteinkomplex
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIK	NFκB-inducing kinase
NLRP3	Nod-like receptor family pyrin domain containing Protein 3
NLRs	Nod-like receptors
NHEK	Normal human epidermal keratinocytes
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
Pro-IL-18	Inaktives IL-18
PSORS	Psoriasis susceptibility loci
qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
RPM	Revolutions per minute
SNP	Single nucleotide polymorphism
T3SS/T4SS	Type III Secretion System / Type IV Secretion System
T _H	T-Helferzellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNS	Trypsin Inhibitor Solution
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

1. Einleitung

1.1. Psoriasis

Bei der Psoriasis (Schuppenflechte) handelt es sich um eine genetisch determinierte, chronische, immunvermittelte, entzündlich-proliferative Hauterkrankung, bei der es in schubartigen oder kontinuierlichen Verläufen zur Ausbildung von charakteristischen erythemato-squamösen Plaques insbesondere an den Streckseiten der Extremitäten kommt.

Bereits im Altertum war das Phänomen der Psoriasis unter anderem als „weiße Lepra“ bekannt und wurde unter anderem von Hippokrates und Galen beschrieben [Gerabek et al., 2007]. Allerdings gelang erst im 19. Jahrhundert dem englischen Arzt Willan die Abgrenzung der Psoriasis zu anderen Hauterkrankungen [Willan, 1796-1808]. Seit jeher hatten die Patienten neben den physischen auch mit den psychischen und sozialen Folgen der Psoriasis zu kämpfen. Heute noch müssen sich Erkrankte mit der stigmatisierenden Wirkung der Psoriasis im privaten und öffentlichen Leben auseinandersetzen. Dabei ist die Einschränkung der Lebensqualität vergleichbar mit der anderer chronischer Erkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck, Arthritis, Depression und Malignomen [Rapp et al., 1999; Choi & Koo, 2003]. Zusätzlich verursacht die Psoriasis-Therapie für die Patienten und für das Gesundheitssystem erhebliche Kosten [Sohn et al., 2006].

1.1.1. Epidemiologie

Die Erkrankungsrate variiert abhängig von der geografischen Region und der ethnischen Zugehörigkeit. In Deutschland gehört die Psoriasis mit einer Prävalenz von 2-3% und somit zirka 2 Millionen Erkrankten zu einer der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen [Mrowietz & Reich, 2009], während sie in Asien oder Zentralafrika viel seltener auftritt. Am häufigsten sind Hellhäutige betroffen, gefolgt von Asiaten und Dunkelhäutigen, wobei indigenen Völker praktisch so gut wie nie betroffen sind [Braun-Falco et al., 2005]. Verschiedene Studien untersuchten die ethnischen Unterschiede bei der Prävalenz von Psoriasis. Eine im Jahr 2001 in den USA durchgeführte Studie zeigte, dass Menschen mit weißen (kaukasischen) Vorfahren

eine Prävalenz von 2,5% aufwiesen, mit schwarzen Vorfahren 1,3% und mit anderen Vorfahren 1,0% [Stern et al., 2004]. Dabei sind Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen. Die Erstmanifestation ist in jedem Lebensalter möglich, jedoch überwiegend im 2. und 3. Lebensjahrzehnt.

Auffällig ist die Assoziation der Psoriasis mit anderen Erkrankungen. So treten das metabolische Syndrom, Adipositas, kardiovaskuläre und psychische Erkrankungen häufig im Zusammenhang mit Psoriasis auf [Lindegard, 1986; Henseler & Christophers, 1995; Davidovici et al., 2010]. All diesen Erkrankungen ist pathophysiologisch unter anderem eine systemische Entzündungsreaktion mit einer Aktivierung von T-Helferzellen-1 (T_H1) Immunmustern gemein. Beim gemeinsamen Auftreten mit der Psoriasis können sich die Erkrankungen in ihren proinflammatorischen Effekten verstärken und den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen [Gerdes & Mrowietz, 2012].

Interessanterweise gilt für Erkrankungen, wie die atopische Dermatitis, allergisches Asthma und Rhinitis, die über T-Helferzellen-2 (T_H2) Immunmuster ablaufen, dass diese Erkrankungen seltener gemeinsam mit der Psoriasis auftreten [Braun-Falco et al., 2005].

1.1.2. Ätiologie

Die Ursachen der Psoriasis sind bis heute noch nicht restlos geklärt. Epidemiologische Studien und Untersuchungen an Familien und Zwillingen, bei denen Familienangehörige an Psoriasis erkrankten, ließen eine genetische Komponente vermuten. So zeigten monozygote zirka 70% und heterozygote Zwillinge zirka 20% Konkordanz-Raten [Farber et al., 1974; Duffy et al., 1993]. Bis heute wurden etliche Polymorphismen und Mutationen beschrieben, die zum Erkrankungsrisiko beitragen. Allgemein wird eine Prädisposition durch multifaktorielle Vererbung mit variabler Penetranz angenommen.

Auf verschiedenen Chromosomen wurden bisher zwölf *Psoriasis susceptibility loci* (PSORS) identifiziert [Coda et al., 2012], innerhalb derer Gene mit Psoriasis assoziiert werden. Diese kodieren unter anderem für Faktoren des HLA-Systems (*Human leukocyte antigen*; insbesondere HLA-Cw6) [Russell et al. 1972; Tiilikainen et al. 1980; Hensler & Christophers, 1985]. Unabhängig der PSORS werden auch andere

Verbindungen zum HLA-System beschrieben, beispielsweise HLA-B13, -Bw57, -B27, -DR4 und -DR7 [Altmeyer & Paech, 2011].

Darüber hinaus beeinflussen über 36 *Single nucleotide polymorphisms* (SNP) das Erkrankungsrisiko [Nair et al., 2009; Tsoi et al., 2012] und mit Interleukin 36RN (IL36RN) und dem *Caspase recruitment domain containing protein 14* (CARD14) wurden erstmals Genmutationen beschrieben, die alleine und unabhängig Psoriasis auslösen können [Loves et al., 2014].

Zusätzlich scheint eine kutane Überexpression von antimikrobiellen Peptiden (AMP), wie beispielsweise Cathelicidin LL-37 (LL-37), eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis zu spielen [Ong et al., 2002; Lande et al., 2007; Ganguly et al., 2009; Lande et al., 2014].

Genetische oder immunologische Veränderungen allein sind jedoch für einen Ausbruch der Krankheit in der Regel nicht ausreichend. Zusätzliche Provokationsfaktoren werden benötigt, um einen Schwellenwert zur Manifestation oder Unterhaltung der Psoriasis zu erreichen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten bekannten Provokationsfaktoren.

Infektionen	<ul style="list-style-type: none"> β-hämolisierende Streptokokken Gruppe A Virale Infekte HIV/AIDS
Medikamente	<ul style="list-style-type: none"> Betablocker (z.B. Propanolol) ACE-Hemmer Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR, z.B. Diclofenac) Lithium Antimalariamittel (z.B. Chloroquin) Rebound nach systemischer Steroidtherapie
Sonstiges	<ul style="list-style-type: none"> Alkohol Rauchen Psychische Belastung (z.B. Stress) Chemische & mechanische Reizung (Köbner-Phänomen) Saisonale Effekte (Herbst, Winter)

Tab. 1: Provokationsfaktoren der Psoriasis (Auswahl). Adaptiert nach Dirschka et al., 2011.

Grundsätzlich ist die Potenz zur Auslösung oder Unterhaltung der Psoriasis durch einen Provokationsfaktor individuell sehr unterschiedlich und auch im Verlauf nicht immer konstant.

Insbesondere bei Kindern und Jugendlichen kann die Psoriasis erstmals durch eine bakterielle Infektion mit Streptokokken im Rahmen einer Tonsillitis oder Infektion der oberen Atemwege auftreten [Gudjonsson et al., 2003]. Bemerkenswert ist die molekulare Ähnlichkeit vom M-Protein der Streptokokken mit dem humanen Keratin-17, welche eine Bildung von Autoantikörpern möglich erscheinen lässt [Altmeyer & Paech, 2011]. Zudem können auch virale Infekte eine Psoriasis ausbrechen lassen.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Medikamente können bei einem Teil der Psoriasis-Patienten zu einem Ausbruch oder einer Verschlechterung der Krankheitsaktivität führen. Dabei wurde vor allem eine Verschlechterung der Schuppenflechte unter Therapie mit Betablockern, ACE-Hemmern, Lithium oder Chloroquin beobachtet [Mrowietz & Schmitt-Ott, 2012].

Die übrigen aufgelisteten Provokationsfaktoren zeigen unterschiedliche Korrelationen mit der Psoriasis. Für Alkohol- und Nikotinabusus wurde eine starke Assoziation mit der Prävalenz, der Schwere und der Dauer der Erkrankung nachgewiesen [Landriscina & Friedman, 2016; Naldi, 2016]. Schwächer gilt dies auch für die verschiedenen Formen von psychischem Stress [Snast et al., 2017]. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit manifester Psoriasis lässt sich durch mechanische Reizung der Haut die Bildung von psoriatischen Läsionen induzieren. Dies wird als Köbner-Phänomen oder isomorpher Reizeffekt bezeichnet [Köbner, 1876].

Auch saisonale Effekte haben einen Einfluss auf die Psoriasis mit einer Verschlechterung der Symptome im Winter und einer Verbesserung im Sommer [Pascoe & Kimball, 2015]. Welchen Anteil hierbei die im Winter höhere Infektrate, die niedrigere UV-Exposition mit möglichem Vitamin D-Mangel, das Klima oder andere Faktoren haben, ist Gegenstand aktueller Forschung [Watad et al., 2017; Yan et al., 2017; Balato et al., 2013].

1.1.3. Pathogenese

Nach heutigem Verständnis beruht die Pathogenese der Psoriasis auf einer komplexen Fehlregulation zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem [Elder et al., 2010].

Im Initialstadium kommt es durch einen Stimulus (siehe Tabelle 1) zum Untergang von Keratinozyten. Die dabei freiwerdende DNA und RNA wird durch das AMP LL-37 gebunden und aktiviert über intrazelluläre Toll-like Rezeptoren 7/9 (TLR 7/9) plasmazytoide dendritische Zellen. Diese wiederum induzieren durch Freisetzung von Interferon- α / β (IFN- α / β) myeloide dendritische Zellen, welche aber auch durch LL-37 gebundene RNA an ihren TLR 8 direkt aktiviert werden können [Lande et al., 2007; Gilliet & Lande 2008; Ganguly et al., 2009].

Die anschließende immunologische Kaskade ist typisch für die chronische kutane Entzündungsreaktion der Psoriasis. Die myeloiden dendritischen Zellen initiieren durch die Produktion insbesondere von IL-12 und IL-23 eine Aktivierung und Differenzierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen (u.a. T-Helferzellen-1, -17, -22 (T_H17, T_H22)) [Lowe et al., 2014]. Eine direkte Induktion von T-Zellen durch an LL-37 komplexierte RNA oder DNA ist auch hier möglich [Lande et al., 2014]. Diese sezernieren unter anderem mit IL-17, IL-22, IFN- γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) verschieden Botenstoffe, die zu dem proinflammatorischen Zytokinmilieu beitragen und rückkoppelnd auf Keratinozyten wirken [Nogales et al., 2008]. Die Keratinozyten führen mit der gesteigerten Bildung von AMPs und Chemokinen zu einer chronischen persistierenden Aktivierung der T-Zellen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten im Sinne eines sich selbstunterhaltenden Entzündungsgeschehens [Nogales et al., 2008]. Folge der kutanen Entzündungsreaktion ist die Migration zusätzlicher T-Zellen in die Epidermis und Dermis. Dabei ermöglichen sogenannte *homing*-Rezeptoren, wie zum Beispiel das auf T-Zellen exprimierte kutane Lymphozyten-assoziierte Antigen (CLA), eine Einwanderung in entsprechende Areale [Berg et al., 1991; Clark et al., 2006; Clark, 2010].

Reaktiv kommt es zu einer überschießenden Proliferation der Keratinozyten ohne Differenzierung (Parakeratose) und einer massiven Verbreiterung der Epidermis (Akanthose) [Eyerich et al., 2012]. Durch Chemotaxis angelockte neutrophile Granulozyten führen zur Bildung von charakteristischen Kogoj Pusteln sowie sterilen

Munroschen Mikroabszessen [Kogoj, 1938; Munro, 1898]. Gefäßproliferation und -dilatation lassen erythematöse Plaques in den betroffenen Arealen entstehen [Murphy et al., 2007].

Die Psoriasis wird heute aufgrund der komplexen immunvermittelten Mechanismen, zusammen mit Krankheiten aus dem rheumatoiden Formenkreis sowie mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, zu der Gruppe der *immune-mediated inflammatory diseases* (IMID) gezählt [Blandizzi et al., 2014].

1.1.4. Klinische Formen der Psoriasis

Bemerkenswerterweise zeigen sich die klinischen Erscheinungsformen der Psoriasis uneinheitlich und lassen sich mit Psoriasis vulgaris, Psoriasis pustulosa und Psoriasis-Arthritis in drei Hauptgruppen einteilen.

Die Psoriasis vulgaris ist mit über 90% die häufigste Variante und wird durch Korrelation von Erkrankungsbeginn und HLA-Muster in zwei Subtypen unterteilt. Die Typ 1-Psoriasis zeigt einen Manifestationsgipfel im 2. und 3. Lebensjahrzehnt sowie eine starke familiäre Korrelation mit den HLA-Allelen CW6, B13, B57 und DRB1 [Henseler & Christophers, 1985]. Die Typ 2-Psoriasis hingegen zeigt einen Manifestationsgipfel im 5. und 6. Lebensjahrzehnt bei schwacher Assoziation mit den HLA-Allelen CW2 sowie B27 [Henseler & Christophers, 1985]. Klassischerweise sind scharf begrenzte erythematöse Plaques mit schwach haftender silbriger Schuppung die charakteristischen Effloreszenzen. Nach mechanischer Entfernung einer Psoriasisschuppe wird typischerweise eine Folge von drei Phänomenen beschrieben: Oberflächlich imponieren die silbrigen Schuppen wie Kerzenwachs („Kerzenwachsphänomen“). Wird die Schuppenauflagerung vollständig entfernt, so zeigt sich eine durchsichtig-glänzende hauchdünne Schicht („Phänomen des letzten Häutchens“). Entfernt man auch diese Schicht entstehen punktförmige Blutungen („Phänomen des blutigen Taus“) [Auspitz, 1870]. Zu den Prädilektionsstellen gehören neben den Streckseiten der Extremitäten, Sakralregion, dem behaartem Kopf auch die Analfalte sowie Bauchnabelregion. Zusätzlich ist ein Befall der Nägel möglich. Je nach Konstellation der Symptome oder Erscheinung werden etliche klinische Subtypen der Psoriasis vulgaris unterschieden. Der Verlauf reicht von singulären, jahrelang persistierenden Herden bis zu generalisierten, häufig rezidivierenden und hochaktiven

Verlaufsformen. [Altmeyer & Paech, 2011]

Bei der Psoriasis pustulosa kommt es durch die massenhafte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zum Auftreten von multiplen epidermalen sterilen Pusteln auf geröteter Haut in unterschiedlichem Ausmaß und Lokalisation. Es werden die lokalisierten von den generalisierten Formen unterschieden. Beide Gruppen weisen eine Assoziation mit Psoriasis vulgaris und eine ungeklärte Pathogenese auf. [Altmeyer & Paech, 2011]

Bei der Psoriasis-Arthritis werden bis zu fünf unterschiedliche, grundsätzlich Rheumafaktor negative, klinische Verlaufsformen unterschieden. Klassischerweise kommt es zu einer asymmetrischen Entzündung der peripheren Gelenke und Entesen im Strahl. Allerdings können auch Kniegelenke, Iliosakralgelenke oder die Wirbelsäule betroffen sein. Dabei können Hauterscheinungen und Nagelveränderungen der Arthritis um Jahre vorausgehen und umgekehrt. Die Pathogenese ist unbekannt, jedoch zeigt sich eine Assoziation mit den HLA-Allelen CW6, B13, B17, B27 und DR7. [Dirschka et al., 2011; Altmeyer & Paech, 2011]

1.2. Interleukin-18

IL-18 ist ein 24000 Da schweres Protein, das zu der IL-1 Familie (IL-1 α , IL-1 β , IL-1 Rezeptor Agonist, IL-18, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9, IL-1F10 und IL-33) gezählt wird [Barksby et al., 2007]. Neben der β -Faltblattstruktur hat IL-18 mit einigen seiner Familienangehörigen (insbesondere IL-1 β) gemeinsam, dass als inaktives Vorläuferprotein (Pro-IL-18) synthetisiert, es intrazellulär durch Proteasen (z.B. Caspase 1) in die biologisch aktive Form überführt wird [Gu et al., 1997]. Zusätzlich teilt es sich ähnliche Wege der intrazellulären Signalgebung und Genregulation [Dinarello et al., 2013]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen wird Pro-IL-18 von fast allen epithelialen Zellen im menschlichen Organismus kontinuierlich gebildet [Puren et al., 1999].

Im Gegensatz zu anderen Zytokinen erfolgt die intrazelluläre Produktion von Pro-IL-18 aufgrund von fehlender N-terminaler Signalpeptide nicht über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, sondern wird ins Zytosol transkribiert und anschließend als Pro-IL-18 von freien Ribosomen translatiert [Lacy & Stow, 2011].

Die Spaltung von Pro-IL-18 zu aktivem IL-18 kann über zwei unterschiedliche Wege

erfolgen: Einerseits klassischerweise über Inflammasome durch Caspase 1 oder andererseits alternativ ohne inflammasomale Beteiligung über sonstige proteolytische Enzyme [Sedimbi et al., 2013].

Nod-like receptors (NLRs) sind zytosolische Proteine, die auf Warnsignale hin große Multiproteinkomplexe, sogenannte Inflammasome, bilden [Martinon et al., 2002]. Je nach Warnsignal werden unterschiedliche Subtypen assembliert, wobei alle schließlich die Entzündungsantwort über Aktivierung insbesondere von IL-1 β und IL-18 anstoßen [Schroder & Tschopp, 2010]. Das *Nod-like receptor family pyrin domain containing Protein 3* (NLRP3)-Inflammasom beispielsweise besteht aus einzelnen NLR-Einheiten, die über das Adapterprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) inaktive Pro-Caspasen 1 binden (siehe Abbildung 1) [Stehlik et al., 2003]. Es folgt eine Assemblierung mehrere dieser entstandenen Einheiten zu einer großen gemeinsamen Struktur, dem NLRP3-Inflammasom [Agostini et al., 2004]. Als Reaktion auf intrazelluläre Warnsignale von Viren [Allen et al., 2009], Bakterien [Duncan et al., 2009], Pilzen [Gross et al., 2009], Toxinen [Gurcel et al., 2006] oder untergehenden Zellen (extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) oder erhöhte intrazelluläre Serumkalium-Konzentrationen) [Muruve et al., 2008] wird unter Abspaltung der Pro-Domäne Caspase 1 gebildet. Diese wiederum aktiviert Pro-IL-18 zu IL-18 mit anschließender Sekretion. [Martinon et al., 2009]

Alternative Mechanismen zur Prozessierung von Pro-IL-18 in die aktive Form umfassen andere Caspasen [Akita et al., 1997], Chymasen [Omoto et al., 2006], Merpine [Banerjee et al., 2008], Proteinase 3 [Sugawara et al., 2001] oder Granzyme B [Omoto et al., 2010] (siehe Abbildung 1). In Lebermakrophagen (Kupffer-Zellen) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch durch anderen Caspasen im Rahmen von induzierter Apoptose über den FAS-Liganden am FAS-Rezeptor (*Cluster of differentiation 95, Apoptosis antigen 1*) IL-18 gebildet werden kann [Tsutsui et al., 2000]. Diese Immunreaktionen sind essentiell in der Homöostase des Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung infizierter, maligner oder beschädigter Zellen.

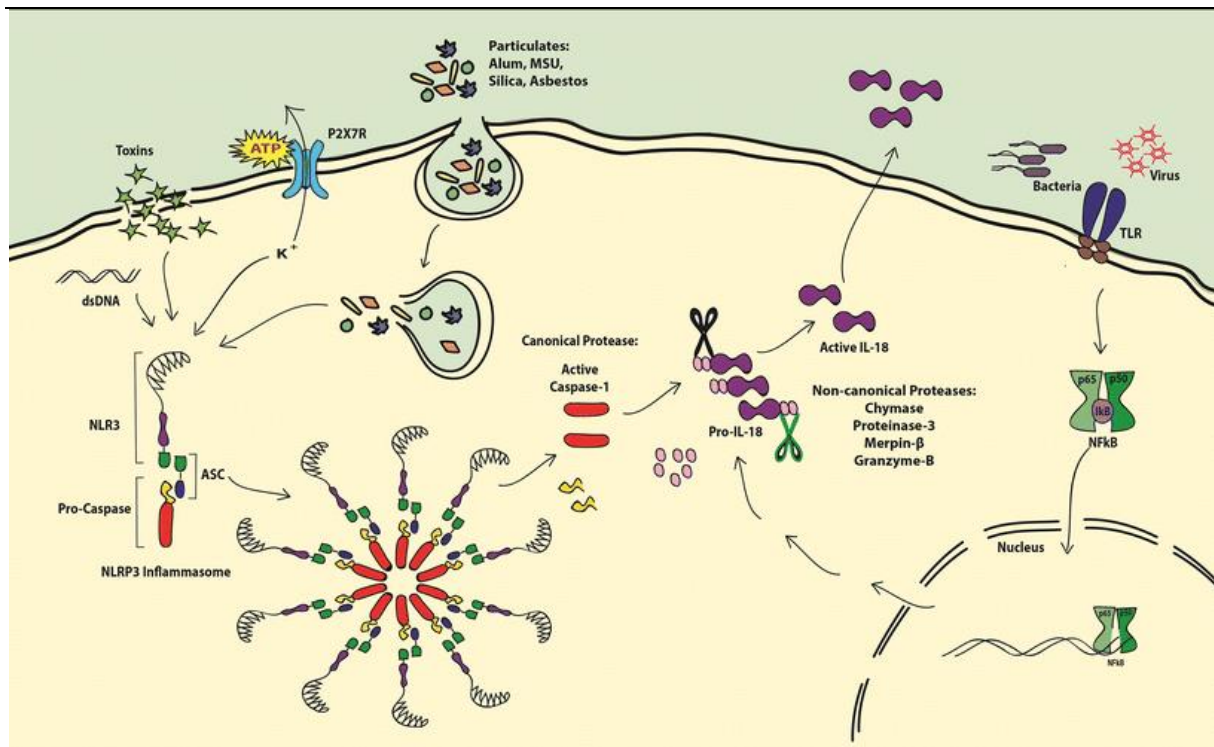


Abb. 1: Induktion der IL-18 Produktion durch verschiedene Stimuli.

Externe Stimuli (u.a. extrazelluläres ATP, Toxine) führen zu einer Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms mit Aktivierung von Pro-Caspase 1 zu Caspase 1. Pro-IL-18 wird klassischerweise von Caspase 1 zu aktivem IL-18 gespalten oder alternativ auch durch Chymase, Proteinase-3, Merpin-β oder Granzyme-B. Die Produktion von Pro-IL-18 kann durch bakterielle oder virale Antigene über den NFκB-Signalweg forciert werden.

Aus Sedimbi et al. (2013) mit freundlicher Erlaubnis des Springer Nature Verlages

Ursprünglich wurde IL-18 aus Mäuseserum als IFN γ -induzierender Faktor isoliert [Nakamura et al., 1993]. Diesen Effekt vermittelt IL-18 extrazellulär über den IL-18 Rezeptor (IL-18R). Bestehend aus einer α - und β -Kette (IL-18R α , IL-18R β) muss der Rezeptor nach Bindung von IL-18 dimerisieren, um die intrazelluläre Signalkette initiieren zu können (siehe Abbildung 2). Im Gegensatz zu IL-18R α , das auf nahezu allen Zellen exprimiert wird, ist IL-18R β jedoch überwiegend auf T-Zellen und dendritischen Zellen präsent [Dinarello et al., 2013]. IL-18 benötigt zudem IL-12 oder IL-15 als Cofaktor, damit genügend IL-18R exprimiert wird [Yoshimoto et al., 1998]. Nach der Dimerisation der Rezeptoruntereinheiten bindet intrazellulär der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) an dem IL-18R, um eine Kaskade von

Phosphorylierungen einzuleiten (siehe Abbildung 2). Beginnend mit der Polymerisation und Phosphorylierung von vier *IL-1R-associated kinase* (IRAK) über die Phosphorylierung von *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6) und *NFκB-inducing kinase* (NIK) erfolgt eine Phosphorylierung von IκB kinase (IKK), welche *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) aktiviert. Im Zellkern leitet NFκB schließlich über Transkription entsprechender Gene die Produktion von IFN γ ein [O'Neill et al., 1998; Dinarello et al., 2013].

Die Aktivität von IL-18 wird durch das natürlich vorkommende *IL-18 binding protein* (IL-18BP) reguliert [Aizawa et al., 1999; Novick et al., 1999]. Ungleichgewichte in der Balance können zu schweren entzündlichen Prozessen führen [Novick et al., 2001]. Daher wird IL-18 bei erhöhten IFN γ -Konzentrationen durch verstärkte Synthese von IL-18BP im Sinne eines negativen Feedbacks reguliert [Muhl et al., 2000; Hurgin et al., 2002].

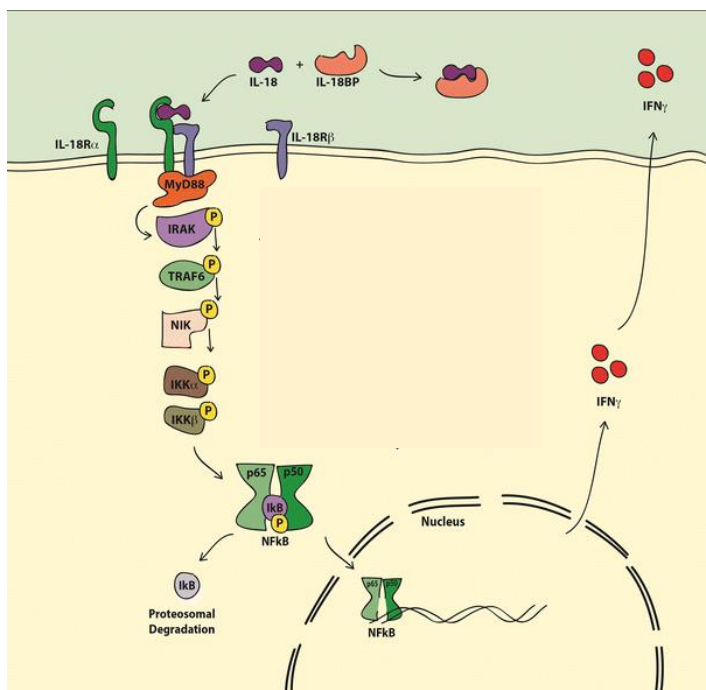


Abb. 2: Der IL-18 Signalweg.

Aktives IL-18 bindet an IL-18R α und dimerisiert anschließend mit IL-18R β . Der Signalkomplex aktiviert über eine intrazelluläre Kaskade von Phosphorylierungen NFκB, welches zur Produktion von IFN γ führt. IL-18BP kann IL-18 binden und neutralisieren.

Adaptiert nach Sedimbi et al. (2013) mit freundlicher Erlaubnis des Springer Nature Verlages

In humanen Keratinozyten konnte das Vorkommen von Inflammasomen [Feldmeyer et al., 2007; Harder & Nunez 2009] und eine konstitutive wie auch reaktive Produktion von Pro-IL-18 oder IL-18 [Naik et al., 1999; Companjen et al., 2000] nachgewiesen werden. Interessanterweise können auch LL-37 und andere AMPs eine Produktion von IL-18 in Keratinozyten hervorrufen [Niyonsaba et al., 2005]. Dabei wirkt das IL-18 vor allem auf periphere mononukleäre Zellen (PBMC) und induziert die Bildung von IFN γ [Sedimbi et al., 2013]. Keratinozyten selbst hingegen bilden unter Einfluss von IL-18 unter anderem mit *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL10) ein T_H1-stimulierendes Chemokin. Sie können zudem an der Zelloberfläche MHC-Klasse-II-Proteinkomplexe (MHC-II) exprimieren, wenn IL-18 als Costimulanz die Wirkung von IFN γ verstärkt. [Kanda et al., 2007].

Insbesondere in Hautproben von Psoriasis-Patienten zeigten sich erhöhte IL-18, IL-18R und Caspase 1-Spiegel [Ohta et al., 2001; Johansen et al., 2007]. Vor allem in aktiven psoriatischen Läsionen und im Serum war IL-18 erhöht [Companjen et al., 2000; Gangemi et al., 2003]. Mit Psoriasis assoziierte Erkrankungen wie beispielsweise Arteriosklerose oder das metabolischen Syndrom zeigen interessanterweise ebenfalls erhöhte IL-18 Spiegel [Mrowietz et al., 2006; Dinarello et al., 2013].

1.3. Lithiumsalze

Lithiumsalze werden bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts in der Therapie von psychischen Erkrankungen eingesetzt [Cade, 1949]. Sie sind ein weit verbreitetes Therapeutikum in der Behandlung von affektiven Störungen (Manie, Depression) und werden zur Behandlung akuter manischer Schübe, Stabilisierung von bipolaren Störungen (Phasenprophylaxe), Steigerung der Wirksamkeit von Antidepressiva (Lithiumaugmentation) und zur Suizidprävention eingesetzt [Herdegen et al., 2013]. Eine weitere Anwendung stellt die prophylaktische Behandlung bei Cluster-Kopfschmerz dar [May et al., 2012].

Aus Lithiumcarbonat oder -acetat dissoziieren die Lithiumsalze nach oraler Einnahme. Dabei werden Lithium-Ionen (Li⁺) analog zu Natrium-Ionen gut resorbiert und reichern sich intrazellulär an. Der Wirkmechanismus ist bisher weitgehend unbekannt. Es wird

angenommen, dass Li^+ über die Inhibition von Glykogen-Kinase-Synthase 3 β (GKS-3 β) und des *Second Messengers* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) die Plastizität von Neuronen beeinflussen [Allison & Stewart, 1971; Estler & Schmidt, 2006].

Bei den kutanen Nebenwirkungen spielt die Psoriasis mit einem Anteil von 2-6% [Chan et al., 2000; Brauchli et al., 2009] eine wichtige Rolle in der Lithiumtherapie. Es kann zur Erstmanifestation oder Exazerbation von Psoriasis kommen [Carter, 1972], wobei eine vorbestehende Psoriasis keine Kontraindikation zur Lithiumtherapie darstellt [Bormann et al., 2014]. Ein Zusammenhang mit der Dosis ist nicht immer gegeben. In Studien hat sich eine Verschlechterung des Hautstatus nach Beginn und Verbesserung bei Abbruch der Medikamenteneinnahme gezeigt [Skoven & Thormann, 1979]. Es kommt häufiger zur Befundverschlechterung, als zu einer Erstmanifestation [Fry & Baker, 2007]. Die Latenz von Erstgabe bis Befundverschlechterung beträgt im Durchschnitt 20 Wochen und bei einer Erstmanifestation 48 Wochen [Tsankov et al., 2000]. Jedoch wird die Fähigkeit von Lithium eine Erstmanifestation von Psoriasis zu provozieren kontrovers diskutiert [Fry & Baker, 2007]. Psoriatische Läsionen, die unter Lithiumtherapie auftraten, scheinen therapieresistenter zu sein [Carter, 1972; Bakker & Pepplinkhuizen, 1976].

Der Pathomechanismus ist weitgehend unbekannt und es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So ist der IP3-Signalweg ein Mechanismus über den Hormone ihre intrazelluläre Wirkung entfalten. Zentraler Bestandteil dieses Signalweges ist die durch IP3 vermittelte intrazelluläre Freisetzung von Calcium. Es wird angenommen, dass Li^+ eine Inhibition der IP3-Signalkaskade bewirkt, was zu einer verminderten intrazellulären Freisetzung von Calcium führt [Estler & Schmidt, 2006]. In Zusammenhang mit Psoriasis erscheint eine durch Li^+ forcierte Störung des Calciumgradienten in der Epidermis psoriatischer Läsionen [Menon & Elias, 1991] sowie die mangelhafte Fähigkeit von psoriatischen Keratinozyten zur intrazellulären Calciumfreisetzung denkbar [Kavonen et al., 2000]. Die Folgen der verminderten Calciumkonzentrationen sind unter anderem die für Psoriasis typische fehlende Differenzierung und Hyperproliferation der Keratinozyten [Rinthal et al., 2014]. Interessanterweise zeigt eine orale Supplementierung mit Inositol bei Lithium assoziierter Psoriasis eine Besserung der Symptome [Allan et al., 2004].

Ockenfels et al. zeigten 1995 eine vermehrte Phosphorylierung von Tyrosin nach Lithiumexposition bei psoriatischen T-Zellen und vermuteten einen Einfluss auf die Pathogenese.

Effekte auf das Zytokinmilieu wurde ebenfalls beschrieben. So weisen Keratinozyten von Psoriasis-Patienten, die mit Lymphozyten zusammen kultiviert wurden, eine Erhöhung der IL-2-, TNF α - und eine massive Erhöhung der IFN γ -Spiegel nach Lithiumexposition auf [Ockenfels et al., 1996]. Interessanterweise zeigten mit Lithium behandelte psoriatische Keratinozyten nach Inkubation mit einem Provokationsfaktor (z.B. Lipopolysacchariden), im Gegensatz zu regulären psoriatischen Keratinozyten, keine eindeutige Zytokinreaktion (IL-1 β , IL-6, TNF α) [Knijff et al., 2005].

Trotz des evidenten Zusammenhanges zwischen Lithium und Psoriasis fehlt in der Literatur bisher jeglicher Nachweis bezüglich etwaiger Effekte von Lithium auf die normalerweise in aktiven psoriatischen Läsionen erhöhten IL-18-Spiegel [Companjen et al., 2000; Gangemi et al., 2003].

1.4. Flagellin

Flagellen sind fadenförmige Organellen, die in einer Vielzahl von Varianten an der Zelloberfläche von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen vorkommen können. Primär dienen sie der Fortbewegung. Sie können aber auch chemotaktische und andere Funktionen erfüllen. Typischerweise besteht eine prokaryotische Flagelle aus einem extrazellulären Filament, das über einen Haken mit dem in der Zelloberfläche verankerten Basalkörper verbunden ist. Im Basalkörper befinden sich unter anderem Motorproteine für die Motilität. Ausschließlicher Bestandteil des Filaments ist das Protein Flagellin. [Fuchs, 2007]

Bisher sind zwei Wege bekannt, über die Flagellin zu einer Immunantwort führt. Hayashi et al. zeigten 2001 erstmalig, dass Flagellin extrazellulär als Pathogen über das Transmembranprotein TLR 5 erkannt und gebunden wird. Nach Dimerisation des Rezeptors folgt eine Signalkette gleich dem IL-18R-Signalweg (siehe Kapitel 1.2.) und mündet über NF κ B in der signifikanten Produktion und Sekretion von IL-8 [Gewirtz, 2006] in epithelialen Zellen oder von TNF α [McDermott et al., 2000; Means et al., 2003] in Monozyten oder dendritischen Zellen [O'Neill et al., 1998].

Der andere Weg führt zur einer Immunantwort auf intrazelluläres Flagellin. Die

bakteriellen Sekretionssysteme Typ 3 und 4 (T3SS, T4SS) sind komplexe Multiproteinstrukturen, die es gramnegativen Bakterien erlauben verschiedene Proteine, Plasmide oder andere Effektoren unter Umgehung des extrazellulären Milieus direkt in die Wirtszelle einzubringen [Coburn et al., 2007; Fronzes et al., 2009]. Über diesen Weg kann auch Flagellin ins Zytosol gelangen, wo es detektiert und zu einer Aktivierung insbesondere des NLRC4-Inflammasomes mit entsprechender Caspase 1 geleiteter Immunantwort durch IL-18 und IL-1 β führt (siehe Kapitel 1.2.) [Miao et al., 2006 & 2007; Koizumi et al., 2011]. Beide Wege führen auch unabhängig voneinander zu einer Immunreaktion [Sanders et al., 2009; Vijay-Kumar et al., 2010]. Bei PBMC konnte gezeigt werden, dass Flagellin zu einer Sekretion von IL-18 und IFN γ führt, ohne dabei einen Effekt auf IL-18BP zu haben [Bachmann et al., 2006]. Ein ubiquitäres Vorkommen in gesunden humanen Keratinozyten der Epidermis konnte für TLR 5 nachgewiesen werden, wobei sich eine Konzentration im Stratum basale zeigte [Baker et al., 2003; Köllisch et al., 2005; Lebre et al., 2007]. Die Aktivierung der Keratinozyten als Teil der angeborenen Immunabwehr über TLR 5 führt zur Sekretion von etlichen Chemokinen und Zytokinen mit Effekten auf verschiedene Zellen der erworbenen Immunität (siehe Kapitel 1.2.) [Lebre et al., 2007]. Bemerkenswerterweise triggert LL-37 synergistisch mit Flagellin in Keratinozyten eine Caspase 1 unabhängige Sekretion von CXCL-8. Dieses fördert die Angiogenese und ist chemotaktisch wirksam über Einflussnahme auf Transkriptionsebene [Nijnik et al., 2011], insbesondere auf neutrophile Granulozyten [Koch et al., 1992; Baggiolini et al., 1989].

Somit erfüllt Flagellin verschiedene Voraussetzungen, um über IL-18 eine Immunantwort in Keratinozyten zu generieren. Jedoch ist die Wirkung von Flagellin auf Keratinozyten bisher kaum erforscht. Insbesondere aufgrund der engen Korrelation der Psoriasis mit bakteriellen Infektionen erscheint daher eine eingehende Untersuchung vielversprechend.

2. Fragestellung

Psoriasis ist mit zirka 2 Millionen Erkrankten allein in Deutschland eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Trotz großer Fortschritte in den vergangenen Jahren bleibt unser Wissen im Verständnis der Pathogenese weiterhin lückenhaft. Insbesondere über die Wirkungsweise von Provokationsfaktoren und das darauf folgenden Initialstadium der Erkrankung ist aufgrund der relativ kurzen Zeitspanne wenig bekannt.

Im Zentrum des kutanen Entzündungsgeschehens steht vor allem ein durch dendritische- und T-Zellen vermitteltes proinflammatorisches Zytokinmilieu. Dabei steht zunehmend IL-18 im Rahmen einer Inflammasom Aktivierung im Fokus. Neben der konstitutiven und reaktiven Produktion von IL-18 in Keratinozyten, sprechen vor allem die stark erhöhten IL-18 Konzentrationen in psoriatischen Läsionen für eine zentrale Rolle. Ebenso ist die Induktion einer IL-18 Produktion in Keratinozyten durch das mit Psoriasis assoziierte LL-37 hierbei interessant. Erhöhte IL-18 Spiegel werden auch in anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Arteriosklerose und dem metabolischen Syndrom gemessen, die beide häufig mit Psoriasis assoziiert sind.

Die Erstmanifestation oder Exazerbation von Psoriasis in der medikamentösen Therapie von psychiatrischen Erkrankungen mit Lithiumsalzen ist seit langem bekannt und gut dokumentiert. Der Wirkmechanismus ist jedoch unklar. Effekte auf Keratinozyten, T-Zellen und das Zytokinmilieu wurden nach Lithium-Exposition beschrieben. Es liegen allerdings keine Untersuchungen vor, ob Lithium eine Wirkung auf die Expression oder Sekretion von IL-18 in humanen Keratinozyten zeigt.

Infektionen sind ein häufiger Provokationsfaktor der Psoriasis. Als bakterieller Virulenzfaktor kann Flagellin eine Freisetzung von etlichen Chemokinen und Zytokinen in humanen Keratinozyten bewirken. Auch ein Synergismus von LL-37 und Flagellin auf die Sekretion des auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirksamen CXCL-8 lässt an eine Verbindung zu Psoriasis denken. Die Sekretion von IL-18 nach Flagellin-Stimulation wurde für PBMC beschrieben, Daten zu humanen Keratinozyten fehlen jedoch bisher.

2. Fragestellung

Um ein besseres Verständnis über die Pathomechanismen der Psoriasis zu erlangen, sollen in dieser Dissertation die Effekte von Lithium und Flagellin auf die Expression und Sekretion von IL-18 durch humane Keratinozyten untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Kultivierung humaner Keratinozyten

Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK, alle verwendeten Materialien finden sich in Tabelle 5, Kapitel 8) wurden in Zellkulturflaschen mit entsprechendem Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Wechsel des Mediums erfolgte täglich. Bei mikroskopischer Subkonfluenz erfolgte die Vorbereitung der Zellen auf die Stimulation oder weitere Subkultivierung.

3.2. Stimulation der NHEK

Zur Vorbereitung wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit *Phosphate buffered saline* gewaschen und mit Hilfe von Trypsin-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle in Lösung überführt. Anschließend erfolgte die Neutralisation des Trypsins mit Trypsin Inhibitor Lösung. Danach wurde die Zellsuspension in eine Zentrifugenröhre überführt, zentrifugiert (1000 rpm (*revolutions per minute*), 5 Minuten, 4°C (alle verwendeten Apparate finden sich in Tabelle 6, Kapitel 8)) und der Überstand abgesaugt. Die Resuspension der Zellen erfolgte anschließend in Zellkulturmedium. Nach mikroskopischer Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Zählkammer wurde eine 6-Loch-Zellkulturplatte mit Zellkulturmedium und je 10⁵ Zellen pro Loch bestückt. Die Platten wurden für 24 Stunden (37°C, 5% CO₂) inkubiert und mikroskopisch auf Subkonfluenz sowie etwaige bakterielle Kontamination kontrolliert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen.

3.2.1. Zeitabhängige Stimulation mit Lithium Chlorid und Flagellin

Die Versuchsanordnung sah eine Inkubation (37°C, 5% CO₂) der NHEK über einen Zeitraum von 4, 24 und 96 Stunden mit Lithium Chlorid [Li et al., 2012] und Flagellin [Means et al., 2003] vor. Dafür wurde Lithium Chlorid in einer Konzentration von 40 mmol [Li et al., 2012] und Flagellin in einer Konzentration von 100 ng/ml [Miao et al., 2006] jeweils in Zellkulturmedium gelöst sowie je eine Kontrolle mit ausschließlich Zellkulturmedium im Sinne einer negativen Blindprobe inkubiert. Bei der Inkubation über 96 Stunden erfolgte ein Wechsel der Medien nach 48 Stunden. Die dabei

ausgetauschten Medien wurden für spätere Untersuchungen in Eppendorf Safe-Lock Tubes® asserviert. Der Versuch wurde parallel in fünf identischen Ansätzen durchgeführt.

3.2.2. Konzentrationsabhängige Stimulation mit Lithium Chlorid

Aufgrund der Ergebnisse in Kapitel 3.2.1. wurde die Wirkung einer konzentrationsabhängigen Stimulation nur bei Lithium Chlorid untersucht. Die Versuchsanordnung sah eine Inkubation (37°C, 5% CO₂) der NHEK über einen Zeitraum von 96 Stunden bei unterschiedlichen Konzentrationen von Lithium Chlorid vor. Lithium Chlorid wurde hierfür in einer Konzentration von 1 mmol, 4 mmol, 10 mmol, 20 mmol, 40 mmol in Zellkulturmedium gelöst [Li et al., 2012] und je eine Kontrolle mit ausschließlich Zellkulturmedium im Sinne einer negativen Blindprobe inkubiert. Der Wechsel der Medien erfolgte nach 48 Stunden analog zu Kapitel 3.2.1.. Der Versuch wurde parallel in drei identischen Ansätzen durchgeführt.

3.3. mRNA-Isolierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die NHEK mikroskopisch auf Konfluenz, Morphologie und mögliche Kontaminationen kontrolliert. Im Anschluss erfolgte die Asservierung der Überstände in Eppendorf Safe-Lock Tubes® für spätere Untersuchungen mittels ELISA (siehe Kapitel 3.6.). Die folgende Isolierung der RNA wurde nach der *Single-Step*-Methode durchgeführt [Chomczynski & Sacchi, 1987]. Zunächst wurden die Zellen mit kaltem PBS (4°C) gewaschen. Um die Zellen in Lösung zu überführen, wurde Trizol zugegeben und die Suspension anschließend in Eppendorf Safe-Lock Tubes® überführt.

Zur Phasenbildung wurde zunächst eine Homogenisierung der Suspension durch mehrfache Resuspension über eine 20G-Kanüle erreicht. Nachfolgend wurde Chloroform zugegeben, die Lösung 30 Sekunden geschüttelt und dann zentrifugiert (13000 rpm, 15 Minuten, 4°C). Die isolierte mRNA (*Messenger ribonucleic acid*) in der klaren oberen Phase wurde in ein neues Eppendorf Safe-Lock Tube® überführt.

Die Reinigung der mRNA wurde eingeleitet durch Zugabe von Isopropanol. Die Lösung ruhte 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) und wurde erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Der nun entstandene Überstand wurde abgegossen, mit

Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert (11000 rpm, 5 Minuten, 4°C).

Der erneut entstandene Überstand wurde abgegossen, die gewonnene mRNA luftgetrocknet und mit RNase freiem Wasser resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Erwärmung der Lösung bei 55°C für 15 Minuten im Thermocycler.

3.4. RNA-Quantifizierung

Bei direkt nachfolgender Quantifizierung ruhten die Proben zunächst für 20 Minuten auf Eis. Bei späterer Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C. Die Kalibrierung des Nano Drop 1000 und der Blindprobe wurde mit RNase freiem Wasser durchgeführt.

Die Konzentration der Ribonukleinsäure wurde photometrisch über Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (A260) gemessen. Eine A260-Extinktion von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl [Sambrook et al., 1989]. Gemäß Herstellerprotokoll wurde die Extinktion zur Detektion von Verunreinigungen zusätzlich bei Wellenlängen von 230 nm (A230, Extinktionsmaximum von Salzen) und 280 nm (A280, Extinktionsmaximum von Proteinen) gemessen. Für eine qualitativ hochwertige Probe mit wenig Kontaminationen spricht ein Quotient aus A260/A280 zwischen 1,5 und 2,0 sowie ein Quotient aus A260/A230 über 2,0.

3.5. cDNA-Synthese

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase wurde isolierte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben [Okayama & Berg, 1982; Gubler & Hoffman, 1983].

Für den ersten Schritt wurden zunächst Oligonukleotide und das Volumenäquivalent von 1 µg isolierter mRNA in ein Eppendorf Safe-Lock Tube® mit RNase freiem Wasser gemischt. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler für 10 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die Oligonukleotide erfüllen als Oligoprimer die Funktion eines Startpunktes für die reverse Transkriptase, indem sie an die Poly-A-Sequenz am 3'-Ende der mRNA binden. Die reverse Transkriptase kann davon ausgehend mit der cDNA-Synthese beginnen. Die Erhitzung auf 70°C dient dabei der Lösung von Sekundärstrukturen.

Im zweiten Schritt wurden die Proben mit den übrigen Synthesekomponenten (siehe Tabelle 2) versetzt und im Thermocycler für 5 Minuten auf 42°C (Temperaturoptimum

der reversen Transkriptase) erwärmt. Es folgte die Zugabe der reversen Transkriptase sowie eine Fortsetzung des Zyklus für weitere 50 Minuten bei 45°C, bevor die Temperatur auf 70°C (Inaktivierung der Enzyme) für 10 Minuten erhöht und abschließend eine Abkühlung auf 4°C durchgeführt wurde.

cDNA -Synthese Mastermix
5x First stand buffer
0,1M Dithiothreitol (DTT)
10mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)

Tab. 2: Komponenten für den zweiten Schritt der cDNA-Synthese.

Bei der cDNA-Synthese erfolgt in einem ersten Schritt die Bindung von Oligoprimern an die Ziel-DNA. In einem zweiten Schritt ermöglichen oben aufgeführte Komponenten ausgehend von den Primern die Synthese einer cDNA durch die reversen Transkriptase.

3.6. Real Time Quantitative PCR

Die spezifische quantitative Bestimmung der IL-18 Expression erfolgte mittels *Real time* quantitativer Polymerase Kettenreaktion (q-PCR). Dazu wurden die IL-18-Abschnitte auf der zuvor synthetisierten cDNA mit Hilfe von IL-18 Primern amplifiziert und in Echtzeit durch Fluoreszenzmessung erfasst [Heid et al., 1996].

Im ersten Schritt erfolgt zunächst die Initialisierung durch Erhitzung der Lösung auf eine Temperatur von 95°C, bei der es zu einer Trennung der DNA-Stränge und Primer kommt.

Beim zweiten Schritt beginnt die Amplifizierung indem die Temperatur auf 66°C gesenkt wird, um eine optimale Primerhybridisierung mit den Zielgenen zu ermöglichen. Anschließend steigt die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Taq-DNA-Polymerase von 72°C und die Elongation mit hinzugegebenen freien Nukleotiden beginnt. Eine erneute Denaturierung beginnt den nächsten Zyklus und es schließen sich 44 Wiederholungszyklen an. Die Ziel-DNA nimmt exponentiell zu. Der genutzte SYBR-Green-I-DNA-Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA und es kommt zu einem Anstieg von fluoreszierender Ziel-DNA, welche am Ende jedes Amplifikations-

Zyklus gemessen wird.

Im letzten Schritt wird die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht und die neu entstandene doppelsträngige DNA wieder aufgeschmolzen. Die gebildeten Fragmente trennen sich bei spezifischen Temperaturen, die Änderung der Fluoreszenz durch freiwerdenden Farbstoff wird detektiert und gibt Rückschlüsse auf die Spezifität der entstandenen Produkte. Es entsteht eine Schmelzkurve. Dabei gilt grundsätzlich, dass spezifische PCR-Produkte eine höhere Schmelztemperatur haben als beispielsweise unspezifische Primer-Dimere.

Für die qPCR wurde zunächst cDNA-Lösung (entsprechend 10 ng cDNA) mit jeweils Reinstwasser, einem Mix aus Taq-DNA-Polymerase und SYBR-Green-I-DNA-Farbstoff sowie mit den Vorwärts- wie auch den Rückwärts-Primern (siehe Tabelle 4) in Kapillaren gegeben. Zusätzlich wurde eine Kapillare als Kontrolle ausschließlich mit Wasser befüllt im Sinne einer negativen Blindprobe. Nach Zentrifugation der Kapillaren (700 rpm, 1 min, 4°C) erfolgte die qPCR im Light-Cycler gemäß des Herstellerprotokolls (siehe Tabelle 3).

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit	Temperaturänderung
Initialisierung	1	95°C	30 sec	20°C / sec
Amplifizierung	45	95°C	10 sec	20°C / sec
		66°C	20 sec	20°C / sec
		72°C	15 sec	20°C / sec
Schmelzkurve	1	95°C	0 sec	20°C / sec
		65°C	15 sec	20°C / sec
		95°C	Kontinuierlich bis Zieltemperatur	0,1°C / sec

Tab. 3: Protokoll der verwendeten Light-Cycler-Einstellung für IL-18 und GAPDH bzw. HPRT.

3. Material und Methoden

Als interner Vergleichsparameter (*Housekeeping Gen*) wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Enzym der Glykolyse, siehe Abbildung 4) bzw. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT, Enzym im Purin Stoffwechsel, siehe Abbildung 3) gewählt. Diese Referenz-Gene können als relativer Mengenvergleich genutzt werden, da sie bei einem konstanten Expressionsniveau keiner Regulation in NHEK unterliegen und somit Hinweise auf etwaige Fehlerquellen (z.B. unterschiedliche DNA-Ausgangsmengen, Varianzen bei der reversen Transkription, etc.) liefern können.

Primer	Richtung	Sequenz 5'→3'
IL-18	IL-18 forward	ACTGGTTCAGCAGCCATCTT
IL-18	IL-18 reverse	TGCAGTCTACACAGCTTCGG
GAPDH	GA forward	CCAGCCGAGCCACATCGCTC
GAPDH	GA reverse	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
HPRT	HPRT forward	ATCAGACTGAAGAGCTATTGTAATGACCA
HPRT	HPRT reverse	TGGCTTATATCCAACACTTCGTG

Tab. 4: Verwendete Primer für die entsprechenden Gensequenzen

3.6.1. Datenauswertung

Die zu Beginn gemessene Hintergrundfluoreszenz weicht in der Amplifikationsphase, mit exponentieller Zunahme der Ziel-DNA, einem quantifizierbaren Anstieg der Fluoreszenz. Der erstmalige signifikante Anstieg über die Hintergrundfluoreszenz hinaus wird mit dem *Cycle Threshold* (Ct-Wert) oder *Crossing Point* (Cp-Wert) bezeichnet. Je später dieser Zeitpunkt erreicht wird, desto unspezifischer gilt das Produkt. Spätestens ab einem Ct-Wert größer 30 gilt das Ergebnis als unbrauchbar.

Bei der Analyse der Daten wurde für die Normierung das GAPDH oder HPRT als interne Kontrolle (siehe Kapitel 3.6.) genutzt. Dafür wurde der GAPDH Ct-Wert oder HPRT Ct-Wert von dem IL-18 Ct-Wert subtrahiert.

$$\Delta Ct = IL-18 Ct - GAPDH Ct$$

oder

$$\Delta Ct = IL-18 Ct - HPRT Ct$$

Mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ -Methode [Livak & Schmittgen, 2001] sollten weitere Fehlerquellen reduziert werden, indem ΔCt der unstimulierten Kontroll-Probe von ΔCt der stimulierten Probe subtrahiert wurde. Der berechnete $\Delta\Delta Ct$ -Wert entsprach der relativen Expression.

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

Die n-fache exponentielle Amplifikation wurde abschließend durch Einsetzen von $\Delta\Delta Ct$ in folgende Formel bestimmt:

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

3.7. ELISA

Die Bestimmung der IL-18 Sekretion durch die NHEK erfolgte mittels eines *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Mit Hilfe immobilisierter IL-18 Antikörper wurde IL-18 adsorbiert und ein sekundärer IL-18 Antikörper mit angebundener Enzymfunktion führte zu einer detektierbaren Farbreaktion („Sandwich-ELISA“) [Engvall & Perlman, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971].

Zur Vorbereitung wurde der primäre Antikörper zusammen mit PBS in jedes Loch der Trägerplatte gegeben und ruhte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Antikörper mit *Blocking Buffer* über 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert. Zur Reinigung der in einer festen Phase immobilisierten Antikörper wurden zwei Waschgänge mit *Wash Buffer* durchgeführt.

Nun erfolgte die Anlage einer Standardreihe in Doppelbestimmung mit bekannter IL-18 Konzentration, um die Führung eines quantitativen Nachweises zu ermöglichen. Dazu wurde *Sample Diluent* und *Human IL18 Standard* (10000 pg/ml) ausgehend von einer Konzentration von 1250 pg/ml fortlaufend im Verhältnis 1:2 verdünnt, so dass

zwei Standardreihen bestehend aus je 8 Löchern (1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml, 39 pg/ml, 20 pg/ml, 0 pg/ml) angelegt wurden.

Für die Messung wurde *Sample Diluent* in die Löcher vorgelegt und mit der Probe (Überstand nach 48h, siehe Kapitel 3.2.2.) beimpft. Die folgenden Schritte beziehen sich auf alle Löcher. Es erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Anschließend wurde das für die Farb-reaktion verantwortliche Reporterenzym (*Streptavidin-Horseradish peroxidase* (HRP)) hinzugefügt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 6 Waschgänge mit *Wash Buffer*. Danach wurde die chromogenen Substratlösung zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die enzymatische Reaktion zu beenden wurde *Stop Solution* beigefügt und im direkten Anschluss der enzymatische Farbumschlag im Photometer bei Wellenlängen von 450nm und 620nm (Referenz) gemäß Herstellerprotokoll gemessen.

3.7.1. Datenauswertung

Beim ELISA ist die enzymatische Farbreaktion direkt proportional zu der gesuchten IL-18 Konzentration. Dadurch ist es möglich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz [Beer, 1852] durch Messung der optischen Extinktion einen quantitativen Nachweis zu führen.

Für die Auswertung erfolgte zunächst die Auftragung der Standardkurve aus den gemittelten Werten der zwei Standardreihen in ein Koordinatensystem (x-Achse IL-18 Konzentration, y-Achse Extinktion). Anschließend konnte den Extinktionswerten der Proben mit Hilfe der Standardkurve ein Konzentrationswert zugewiesen werden. Aufgrund der Verdünnung von 1:2 mit dem *Sample Diluent* mussten die Konzentrationswerte mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Open Office Calc 4.0.1. (siehe Tabelle 6, Kapitel 8). Bei der statistischen Bewertung der Ergebnisse wurde für die Lageschätzung der Parameter ein Konfidenzintervall von 95% (95%-CI) gewählt. Für die Bewertung der Signifikanz wurde aufgrund von zum Teil heterogenen Varianzen und unterschiedlichen Datenpunkten in den zu vergleichenden Gruppen ein

3. Material und Methoden

Zweistichproben-t-Test mit einer ungepoolten Standardabweichung nach Welch [Welch, 1947] genutzt. P-Werte $< 0,05$ wurden dabei als statistisch signifikant und P-Wert $< 0,01$ als statistisch sehr signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der zeitabhängigen Stimulation mit Lithium Chlorid und Flagellin

Der Versuchsansatz sollte die Wirkung von bekannten Provokationsfaktoren der Psoriasis auf die Expression von IL-18 mRNA im zeitlichen Verlauf untersuchen. Dazu wurden NHEK über 4, 24 und 96 Stunden jeweils mit Lithium Chlorid (40mmol) und Flagellin (100ng/ml) im Vergleich zu einer Kontrolle inkubiert (siehe Kapitel 3.2.1.).

Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle der Zellen während und am Ende der Inkubationszeit fielen die mit Lithium Chlorid inkubierten NHEK gegenüber der Flagellin- und Kontrolle-Gruppe durch morphologische Veränderungen auf. Ab 24h Inkubationszeit zeigten die Zellen zunehmend große vakuolige Einschlüsse und ein amorphes Zellbild. Dabei nahm auch die Zahl von toten Zellen zu, bei gleichzeitig abnehmender Konfluenz des Zellrasens von zunächst 90% auf bis zu 50%. Diese Effekte waren bei der Flagellin- und Kontroll-Gruppe, wo ein dichter Zellrasen mit kleinzelligem Mosaik vorlag, nicht zu finden.

4.1.1. PCR

Die Ergebnisse der qPCR zeigten bei den mit Lithium Chlorid inkubierten Zellen nach 4 Stunden zunächst einen signifikanten Abfall, gefolgt von einem sehr signifikanten Anstieg nach 24 Stunden und einem weiteren signifikanten Anstieg nach 96 Stunden der relativen Expression von IL-18 im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3). Relativ bedeutet diese zunächst einen Abfall um das 0,35fache mit anschließender Steigerung nach 24 Stunden um das 0,75fache und nach 96 Stunden um das 23fache gegenüber der Kontrolle. Dabei fällt insbesondere die starke Zunahme der Länge des Konfidenzintervalles bei 96h auf.

Für Flagellin zeigte sich in allen drei beobachteten Zeiträumen eine niedrigere Expression ohne statistische Signifikanz im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Aufgrund des ausbleibenden Effektes von Flagellin auf die mRNA-Expression von IL-18 in NHEK wurde Flagellin für das weitere experimentelle Vorgehen nicht mehr berücksichtigt.

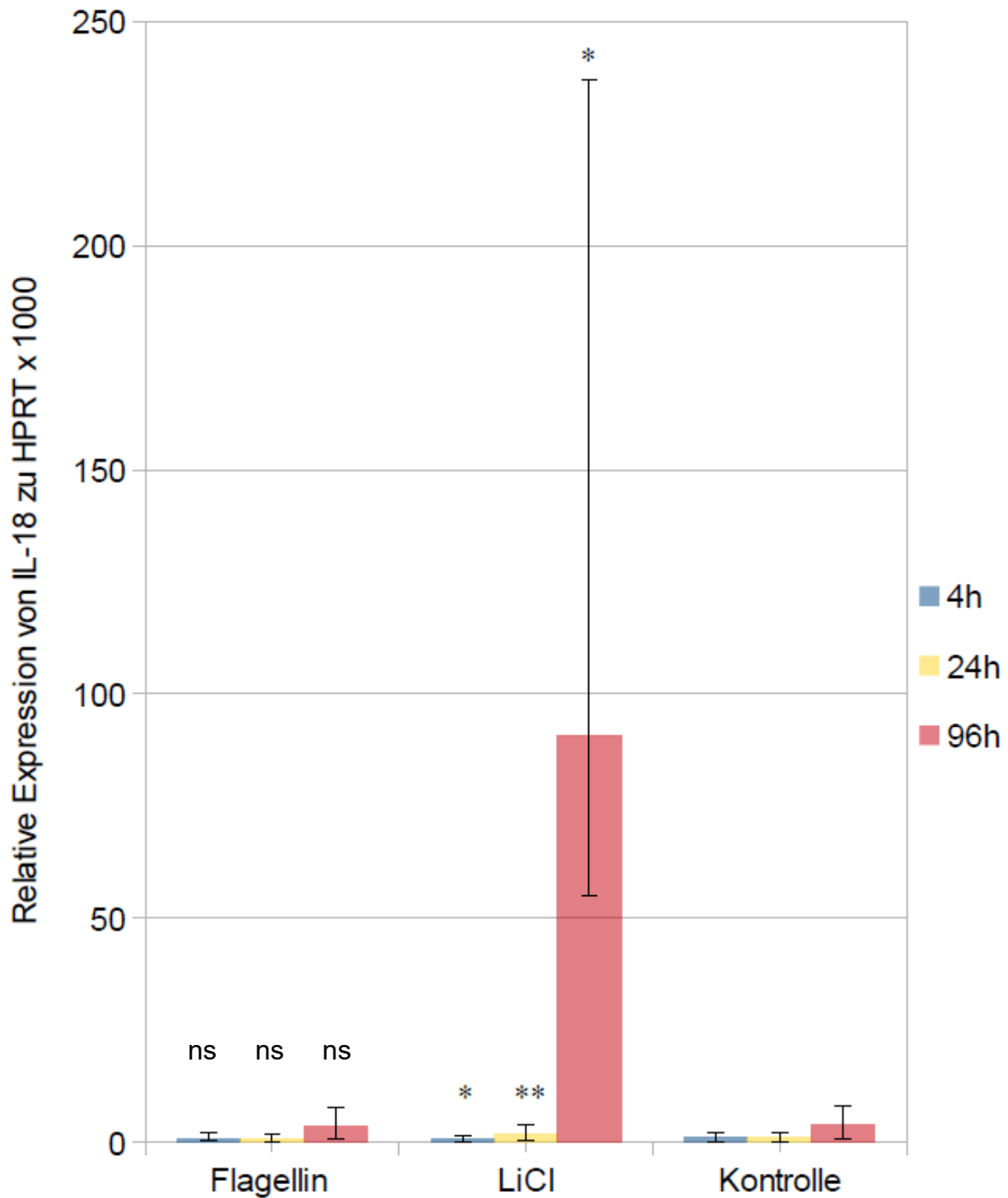


Abb. 3: Relative Expression von IL-18 mRNA zu HPRT.

NHEK wurden 4, 24 und 96 Stunden mit jeweils 40mmol Lithium Chlorid und 100ng/ml Flagellin im Vergleich zu einer Kontrolle inkubiert (Mittelwerte und 95%-CI von n = 5 Versuchen, * p < 0,05; ** p < 0,01, Zweistichproben-t-Test, ns = nicht signifikant).

4.2. Analyse der konzentrationsabhängigen Stimulation mit Lithium Chlorid

Für die Ermittlung der optimalen Lithium Chlorid Konzentration zur Erzeugung der maximalen IL-18 mRNA Expression wurden in diesem Versuchsansatz die NHEK mit fünf verschiedenen Lithium Chlorid Konzentrationen (1 mmol, 4 mmol, 10 mmol, 20 mmol, 40 mmol) im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Lithium Chlorid über einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert (siehe Kapitel 3.2.2.).

Bei lichtmikroskopischen Kontrollen stellten sich bei den Zellen im zeitlichen Verlauf insbesondere bei höheren Lithium Chlorid Konzentrationen ab 10 mmol zunehmend morphologische Veränderungen ein. Wie auch in Kapitel 4.1. zeigten hier die Zellen große vakuolige Einschlüsse, ein amorphes Zellbild und eine Zunahme von toten Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der Zellrasenkonzfluenz auf bis zu 40%. Die Kontroll-Gruppe zeigte diese Veränderungen hingegen nicht.

4.2.1. PCR

Bei niedrigen Lithium Chlorid Konzentrationen bis 10 mmol zeigte sich in der qPCR die Expression von IL-18 gegenüber der Kontrolle im Mittel gemindert (siehe Abbildung 4). Erst bei Konzentrationen von 20 mmol war die Expression leicht und bei 40 mmol um das etwa 3fache gegenüber der Kontrolle erhöht. Außer für den Versuch mit 40mmol weisen die überlappenden Fehlerbalkendiagramme in den Versuchen von 1mmol bis 20mmol auf eine fehlende Signifikanz der Ergebnisse hin. Auffällig ist die Zunahme der Länge des Konfidenzintervalls bei 40mmol, was sich durch die höhere Varianz der Daten erklärt. Der Zweistichproben-t-Test ergibt eine statistisch fehlende Signifikanz für alle untersuchten Lithium Chlorid Konzentrationen.

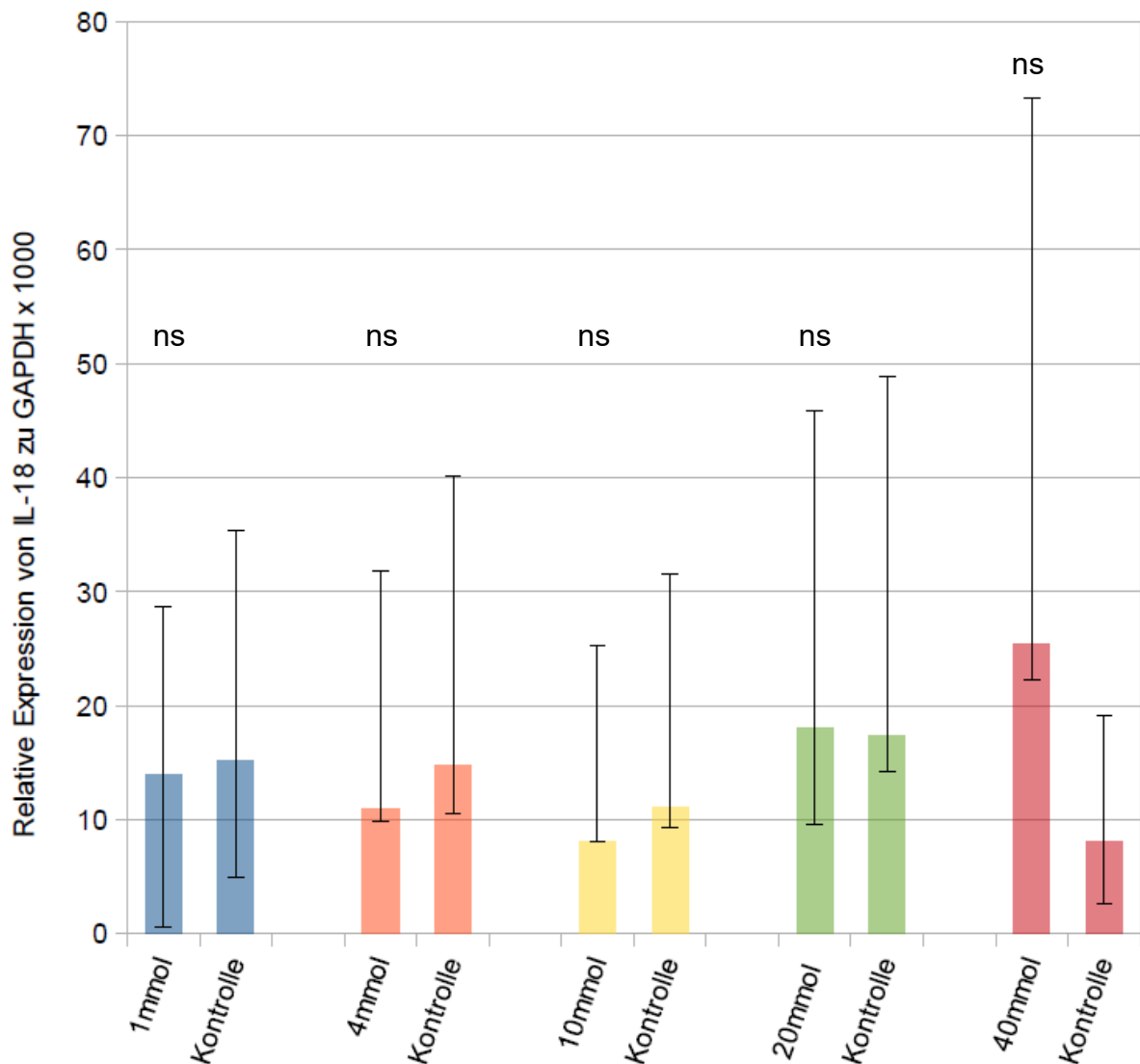


Abb. 4: Relative Expression von IL-18 zu GAPDH bei unterschiedlichen Konzentrationen von Lithium Chlorid.

NHEK wurden mit Lithium Chlorid Konzentrationen von 1 mmol, 4 mmol, 10 mmol, 20 mmol, 40 mmol im Vergleich zu einer Kontrolle über einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert (Mittelwerte und 95%-CI von n = 3 Versuchen, Zweistichproben-t-Test, ns = nicht signifikant).

4.2.2. ELISA

Für die Quantifizierung der IL-18 Sekretion mittels ELISA wurden Überstände nach 48 Stunden gewonnen und untersucht (siehe Kapitel 3.2.2.).

Die Ergebnisse aller Proben, mit Ausnahme der Standardkurve, waren negativ bzw. lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 20 pg/ml.

5. Diskussion

Im Zentrum der Pathogenese der Psoriasis steht ein durch dendritische- und T-Zellen vermitteltes sich selbstunterhaltendes proinflammatorisches Zytokinmilieu [Nogral et al., 2008]. Eine zentrale Rolle wird dabei zunehmend IL-18 im Rahmen einer Inflammation Aktivierung zugeschrieben [Feldmeyer et al., 2007; Harder & Nunez 2009]. Die grundsätzliche Fähigkeit von Keratinozyten zur konstitutiven und reaktiven IL-18 Produktion mit Bildung hoher IL-18 Konzentrationen in psoriatischen Läsionen scheint diese Theorie zu stützen [Naik et al., 1999; Companjen et al. 2000].

Provokationsfaktoren spielen bei der Entstehung und insbesondere bei der Exazerbation der Erkrankung eine wesentliche Rolle. Viele verschiedene Provokationsfaktoren sind bekannt, wobei der Wirkmechanismus häufig unklar ist. Dies gilt zum Beispiel für bakterielle Infektionen wie auch für medikamentös genutzte Lithiumsalze, die zu einem Ausbruch oder einer Verschlechterung der Psoriasis führen können [Dirschka et al., 2011]. Weder für Lithiumsalze noch für Flagellin, als bakterieller Virulenzfaktor im Rahmen von Infektionen, sind Effekte auf die Expression und Sekretion von IL-18 durch humane Keratinozyten publiziert.

5.1. Einfluss von Flagellin auf die Expression von IL-18

Bei Flagellin sind zwei Mechanismen bekannt, die zu einer Immunantwort führen. Beide scheinen der bei Psoriasis ablaufenden Kaskade von Enzymreaktionen zu ähneln und möglicherweise zu ergänzen. So vollzieht sich bei Zellen von Säugetieren die Erkennung des Flagellins als Pathogen über den TLR 5 mit einer anschließenden Aktivierung von NFκB [Hayashi et al., 2001]. Dies führt, durch Sekretion von verschiedenen Zytokinen, zu einer Immunreaktion ähnlich der bei Psoriasis typischen IL-18 vermittelten Immunreaktion [Dinarello et al., 2013]. Bei gesunden humanen Keratinozyten konnte das Vorkommen von TLR 5 ubiquitär in der Epidermis nachgewiesen werden [Baker et al., 2003; Köllisch et al., 2005; Lebre et al., 2007]. Daher erscheint ein proinflammatorischer Effekt durch Flagellin am TLR 5 auch bei Keratinozyten möglich. Die Verteilung von TLR 5 zeigt in gesunder Epidermis eine überwiegende Konzentration auf die Keratinozyten des Stratum basale.

Interessanterweise sind in chronischen psoriatischen Läsionen die Expressionsmuster von TLR 5 bei Keratinozyten im Vergleich zu Proben gesunder Patienten reduziert [Baker et al., 2003]. Ob Pathogene einen Einfluss insbesondere in einem frühen Stadium der Erkrankung auf das Verteilungsmuster von TLR 5 haben, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

Beim zweiten Mechanismus über den Flagellin eine Immunantwort provoziert, internalisieren T3SS und T4SS das Pathogen und stoßen eine Aktivierung des NLRP4 Inflammasoms an [Miao et al., 2006 & 2007; Koizumi et al. 2011]. Die folgende Caspase-1-Aktivität ließe, analog zu beispielsweise NLRP3, eine steigende zytosolische IL-18 Konzentration durch Spaltung von proIL-18 zu IL-18 in Keratinozyten erwarten (siehe Kapitel 1.2.). Die bei PBMC gezeigte Sekretion von IL-18 nach Stimulation mit Flagellin scheint dies zu bestätigen [Bachmann et al., 2006]. In unseren Versuchen konnten wir in der zeitabhängigen Stimulation von NHEK mit Flagellin über den Zeitraum von bis zu 96 Stunden keine signifikante Steigerung der Expression von IL-18 mRNA mittels qPCR nachweisen. Aus diesem Grund wurde auf weitere Untersuchungen von Flagellin in Bezug auf eine konzentrationsabhängige Stimulation und die Sekretion von IL-18 Protein verzichtet.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob die insbesondere durch grampositive Bakterien induzierte Exazerbation der Psoriasis auch durch Flagellin möglich ist, da es überwiegend bei Gram-negativen Bakterien vorkommt.

Ob zu einem signifikanten Effekt auf die Expression und Sekretion von IL-18 durch Flagellin weitere Co-Faktoren benötigt werden, bleibt Gegenstand weiterer Forschung. Mechanismen, wie der Synergismus zwischen Flagellin und LL-37 auf die Sekretion von CXCL-8 mit konsekutiver Neoangiogenese und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten scheinen denkbar [Baggiolini et al., 1989; Koch et al., 1992; Nijnik et al., 2011].

5.2. Einfluss von Lithium Chlorid auf die Expression und Sekretion von IL-18

Die Effekte von Lithiumsalzen auf die Erstmanifestation und die Exazerbation einer Psoriasis wurden in der Literatur schon früh beschrieben [Carter, 1972; Skoven & Thormann, 1979]. Der Pathomechanismus hingegen ist weitgehend unbekannt. Angenommen wird, dass Li⁺-Ionen den IP3-Signalweg blockieren und eine

verminderte intrazelluläre Freisetzung von Calcium bewirken können [Estler & Schmidt, 2006]. Dies scheint durch die generelle Störung des Calciumgradienten in der Epidermis psoriatischer Läsionen [Menon & Elias, 1991], die mangelhafte Fähigkeit psoriatischer Keratinozyten zur intrazellulären Calciumfreisetzung [Kavonen et al., 2000] und die daraus folgende Hyperproliferation ohne adäquate Differenzierung plausibel [Rinthal et al., 2014]. Die orale Supplementierung mit Inositol bei Lithium assoziierter Psoriasis zeigt eine Linderung der Symptome und scheint diese Theorie zu stützen [Allan et al., 2004]. Ob Lithiumsalze auch das Zytokinmilieu von Keratinozyten beeinflussen, ist unbekannt. Vielversprechend sind Daten, dass mit Lymphozyten kokultivierte Keratinozyten nach Lithium-Exposition insbesondere durch IFN γ eine deutliche Zytokin-Antwort generieren [Ockenfels et al., 1996].

Bei der Analyse der Expression von IL-18 mRNA in der zeitabhängigen Stimulation mit Lithium Chlorid konnte im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe nach 4 Stunden zunächst ein signifikanter Abfall, gefolgt von einem sehr signifikanten Anstieg nach 24 Stunden und einem signifikanten Anstieg nach 96 Stunden gezeigt werden. Mit Zunahme der Inkubationsdauer zeigten die Zellen morphologische Anzeichen zunehmender Toxizität. Dies deckt sich mit der von Li et al. (2012) beobachteten Wirkung durch Lithium Chlorid gleicher Konzentrationen auf Keratinozyten. Im Gegensatz zu Li et al. zeigte sich bei uns jedoch durch Zelltod eine deutliche Abnahme der Zellzahl.

Auch in der konzentrationsabhängigen Stimulation zeigten die Konzentrationen von 1mmol bis 10mmol Lithium Chlorid zunächst einen (nicht signifikanten) Abfall der IL-18 Konzentrationen. Es wurden mit steigender Konzentration zunehmende morphologische Veränderungen beobachtet, allerdings ohne einen signifikanten Anstieg der Expression von IL-18 mRNA bei Lithium Chlorid Konzentration von bis zu 40mmol erneut bestätigen zu können. Die Gründe hierfür sind unklar.

In diesem Zusammenhang kritisch zu hinterfragen ist der Einsatz von zwei unterschiedlichen *Housekeeping* Genen als Referenz. Vor allem die Reproduzierbarkeit von GAPDH-Expressionsmustern wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert [Bustin, 2000] und weist eine Varianz unter anderem in unterschiedlichen Gewebearten [Lin & Redies, 2012] oder Zelldichten [Greer et al., 2010] auf. Jedoch sind die Unterschiede bei Zellen identischen Typs und Ursprungs gering [Barber et al., 2005]. Daher scheint bei ansonsten identischen Zellen und

Untersuchungsbedingungen vor allem die Nutzung von je zwei unterschiedlichen *Housekeeping* Genen innerhalb einer Fragestellung als Schwäche in unserem Versuchsdesign. GAPDH könnte im Gegensatz zu HPRT beispielsweise eine höhere Expression aufweisen und damit die relative Expressionsrate des IL-18 verfälschen sowie die Vergleichbarkeit zwischen zwei Experimenten durch unterschiedliche Varianz negativ beeinflussen. Bei Nutzung zweier unterschiedlicher *Housekeeping* Gene wäre daher eine gemeinsame Verwendung für jedes Experiment im Sinne einer doppelten Referenz die bessere Wahl. Grundsätzlich kritisch zu sehen sind hierbei die in vitro verwendete Konzentrationen, die den engen therapeutischen Spiegel in vivo von 0,6 bis 0,1mmol/l deutlich übersteigen [Herdegen et al., 2013]. Die in unserem Versuchsansatz genutzten deutlich höheren Lithium Chlorid Konzentrationen werfen die Frage nach der Übertragbarkeit in vivo auf.

Die mittels ELISA detektierte Sekretion von IL-18 Protein war in beiden Versuchsansätzen nicht signifikant gesteigert. Abschließend lässt sich somit keine reproduzierbare Beeinflussung der Expression und Sekretion von IL-18 durch Lithium Chlorid nachweisen.

Somit bestätigen unsere Ergebnisse das heterogene Spektrum der Lithium-Effekte auf das Zytokinmilieu, das in der Literatur beschrieben wird: Von Anstieg [Maes et al. 1999] über keinen Effekt [Himmerich et al. 2014] bis Abfall [Arena et al. 1997] von proinflammatorischen Zytokinen wird in vivo und vitro berichtet. Zuletzt konnte die proinflammatorische Wirkung von Lithiumsalzen von Petersein et al. (2015) in vivo bestätigt werden. Dabei zeigten Lithiumkonzentrationen in therapeutischen Bereichen einen immunstimulierenden Effekt unter anderem auf die Interleukine IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17 und TNF- α in humanen Blut. Ob die Ergebnisse auf humane Keratinozyten in vitro übertragbar sind und somit einen weiteren Baustein im Verständnis des Pathomechanismus bei der Erstmanifestation oder Exazerbation der Psoriasis darstellen, bleibt abzuwarten.

6. Zusammenfassung

Die Psoriasis ist eine chronische, entzündliche Hauterkrankung multifaktorieller Genese, die auf einer Fehlregulation zwischen erworbenem und angeborenem Immunsystem beruht. Aufgrund der komplexen immunvermittelten Mechanismen wird die Psoriasis zu den *immune-mediated inflammatory diseases* gezählt und ist mit einer Prävalenz von bis zu drei Prozent eine der häufigsten chronischen, entzündlichen Erkrankungen in Deutschland.

Das histopathologische Erscheinungsbild setzt sich typischerweise aus entzündlichen epidermalen Infiltraten mit reaktiver Akanthose und Parakeratose zusammen. Das kutane Entzündungsgeschehen ist durch ein von dendritischen und T-Zellen vermitteltes proinflammatorisches Zytokinmilieu gekennzeichnet, in dessen Mittelpunkt unter anderem Interleukin-18 steht. Dieses Zytokin liegt im Zytosol als inaktives Vorläuferprotein vor und wird erst durch die Bildung von großen zytosolischen Multiproteinkomplexen, den Inflammasomen, aktiviert. In der prozessierten Form vermittelt Interleukin-18 intra- sowie extrazellulär unter anderem die Induktion von Apoptose. Neben dem Vorkommen von Inflammasomen, der konstitutiven und induzierten Produktion von Interleukin-18 in humanen Keratinozyten, sprechen vor allem die stark erhöhten Interleukin-18 Konzentrationen in psoriatischen Läsionen für eine zentrale Rolle dieses Zytokins. Erhöhte Interleukin-18 Spiegel werden auch bei anderen chronischen, entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise der Arteriosklerose und dem metabolischen Syndrom gemessen, die beide häufig mit Psoriasis assoziiert sind.

Neben genetischen und immunologischen Faktoren führen häufig erst verschiedene Provokationsfaktoren zur Erstmanifestation oder Exazerbation einer Psoriasis. Beispielsweise sind bakterielle Infektionen und medikamentös genutzte Lithiumsalze bekannte Provokationsfaktoren, über deren Pathomechanismus im Zusammenhang mit Psoriasis wenig bekannt ist. Lithiumsalze spielen heute in der Therapie von psychischen Erkrankungen eine wichtige Rolle, ohne dass der genaue Wirkmechanismus bisher bekannt ist. Dies gilt ebenso für den Pathomechanismus über den Lithiumsalze die Manifestation oder Exazerbation einer Psoriasis auslösen

können. Vereinzelte Hinweise deuten auf einen Einfluss von Lithiumsalzen auf humane Keratinozyten, T-Zellen und das Zytokinmilieu hin, jedoch liegen keine Untersuchungen bezüglich der Wirkung auf Interleukin-18 in humanen Keratinozyten vor. Flagellin ist Bestandteil von bakteriellen Flagellen und gilt als Virulenzfaktor, der eine Freisetzung von verschiedensten Chemo- und Zytokinen in humanen Keratinozyten bewirken kann, ohne dass bisher ein Effekt auf Interleukin-18 publiziert worden wäre.

Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, die Wirkung von Flagellin und Lithium Chlorid auf die Expression von Interleukin-18 mRNA sowie die Sekretion von Interleukin-18 Protein in primären humanen Keratinozyten mittels qPCR bzw. ELISA zu untersuchen.

In mehreren Versuchsreihen wurde eine zeitabhängige Wirkung von Flagellin und Lithium Chlorid auf die Interleukin-18 Produktion in einem Zeitraum von 4 bis 96 Stunden untersucht und ein signifikanter Abfall nach 4 Stunden sowie ein signifikanter Anstieg ab 24 Stunden bei Inkubation mit Lithium Chlorid festgestellt. Bei Flagellin zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt.

Eine Konzentrationsreihe von 1 bis 40 mmol Lithium Chlorid konnte eine Wirkung auf die Interleukin-18 mRNA Expression, nicht aber auf die Proteinsekretion zeigen. Hohe Konzentrationen von Lithium Chlorid und lange Inkubationszeiten (96 Stunden) waren jedoch Auslöser zytotoxischer Reaktionen. Insgesamt konnte allerdings keine signifikante Wirkung von Lithium Chlorid auf Expression sowie Sekretion von Interleukin-18 in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden.

Damit erscheint eine pathophysiologisch relevante Induktion von Interleukin-18 in humanen Keratinozyten isoliert durch Lithium Chlorid oder Flagellin als Erklärung für eine Exazerbation oder Manifestation der Psoriasis unwahrscheinlich.

7. Literaturverzeichnis

- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J (2004): „NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder.“ In: *Immunity* 2004, 20: 319–325
- Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, Takakura-Yamamoto R, Torigoe K, Gu Y, Su MS (1997): "Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells." In: *J Biol Chem* 1997, 272: 26595–26603
- Aizawa Y, Akita K, Taniai M, Torigoe K, Mori T, Nishida Y, Ushio S, Nukada Y, Tanimoto T, Ikegami H (1999): "Cloning and expression of interleukin-18 binding protein." In: *FEBS Lett* 1999, 445: 338–342
- Allan SJR, Kavanagh GM, Herdt RM (2004): "The effect of inositol supplements on the psoriasis of patients taking lithium: randomised placebo-controlled trial." In: *Br J Dermatol* 2004, 150: 966-969
- Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP (2009): „The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA.“ In: *Immunity* 2009, 30: 556–565
- Allison JH, Stewart MA (1971): "Reduced brain inositol in lithium-treated rats." In: *Nat New Biol.* 1971, 233 (43): 267-268
- Altmeyer P, Paech V (2011): „Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin; Band 2: M-Z, Verzeichnisse“, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- Arena A, Capozza AB, Orlando ME, Currò F, Losi E, Chillemi S, Mesiti M, Merendino RA (1997): "In vitro effects of lithium chloride on TNF alpha and IL-6 production by monocytes from breast cancer patients" In: *J Chemother* 1997, 9(3): 219-226.
- Auspitz H (1870): „Über das Verhältnis der Oberhaut zur Papillarschicht, insbesondere bei pathologischen Zuständen der Haut.“ In: *Arch Derm Syph* 1870, 2: 24-58
- Bachmann M, Horn K, Poleganov MA, Paulukat J, Nold M, Pfeilschifter J, Mühl H (2006): "Interleukin-18 secretion and Th1-like cytokine responses in human peripheral blood mononuclear cells under the influence of the toll-like receptor-5 ligand flagellin" In: *Cellular Microbiology* 2006, 8 (2): 289–300
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL (1989): "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." In: *J Clin Invest.* 1989, 84(4): 1045-1049

- Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L (2003): "Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis." In: *Br J Dermatol.* 2003, 148(4): 670-679
- Bakker JB, Pepplinkhuizen L (1976): "More about the relationship of lithium to psoriasis." In: *Psychosomatics* 1976, 17: 143-146
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005): "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." In: *Physiol Genomics.* 2005, 11;21(3): 389-95
- Blandizzi C, Gionchetti P, Armuzzi A, Caporali R, Chimenti S, Cimaz R, Cimino L, Lapadula G, Lionetti P, Marchesoni A, Marcellusi A, Mennini FS, Salvarani C, Girolomoni G (2014): "The role of tumour necrosis factor in the pathogenesis of immune-mediated diseases." In: *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2014, 27: 1-10
- Balato N, Di Costanzo L, Patrino C, Patri A, Ayala F (2013): „Effect of weather and environmental factors on the clinical course of psoriasis.“ In: *Occup Environ Med.* 2013, 70(8): 600
- Banerjee S, Bond JS (2008): "Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation." In: *J Biol Chem* 2008, 283: 31371–31377
- Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ (2007): "The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders." In: *Clin Exp Immunol* 2007, 149: 217–225
- Beer A (1852): „Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten.“ In: J. C. Poggendorff (Hrsg.), *Annalen der Physik und Chemie*, Bd.86, Erstes Stück, S. 78–88, Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig
- Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK (1991): "The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1." In: *J Exp Med* 1991, 174: 1461–1466
- Bormann E, Brunner P, Dassinger M, Doll A, Hübner K, Kober M, Kuhlmann A, Löwe M, Resch S, Selz C, Sy K (2014): "Rote Liste 2014" Rote Liste Service GmbH, Frankfurt am Main
- Brauchli YB, Jick SS, Curtin F, Meier CR (2009): "Lithium, Antipsychotics, and Risk of Psoriasis" In: *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2009, 29: 134-140
- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (2005): „Dermatologie und Venerologie“, 5. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg

- Bustin SA (2000): "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." In: *J Mol Endocrinol.* 2000, 25(2): 169-93.
- Cade JF (1949): "Lithium salts in the treatment of psychotic excitement." In: *Bull World Health Organ.* 2000, 78: 518-520
- Carter TN (1972): "The Relationship of Lithium Carbonate to Psoriasis" In: *Psychosomatics* 1972, 13/5: 325-327
- Chan HHL, Wing YK, Sua R, Van Krevela C, Lee S (2000). "A control study of the cutaneous side effects of chronic lithium therapy" In: *Journal of Affective Disorders* 2000, 57: 107–113
- Choi J, Koo JYM (2003): „Quality of life issues in psoriasis“ In: *J Am Acad Dermatol* 2003, 49: 57-61
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." In: *Anal Biochem.* 1987, 162(1): 156-159
- Clark RA (2010): "Skin-resident T cells: the ups and downs of onsite immunity." *J. Investig. Dermatol.* 2010, 130: 362–370
- Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. (2006): "The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin." In: *J. Immunol.* 2006, 176: 4431–4439
- Coburn B, Sekirov I, Finlay BB (2007): „Type III Secretion Systems and Disease.“ In: *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(4): 535–549
- Coda AB, Icen M, Smith JR, Animesh AA (2012): "Global transcriptional analysis of psoriatic skin and blood confirms known disease-associated pathways and highlights novel genomic “hot spots” for differentially expressed genes." In: *Genomics* 2012, 100/1: 18–26
- Companjen AR, van der Velden VH, Vooy A, Debets R, Benner R, Prens EP (2000): "Human keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form." In: *Eur Cytokine Netw* 2000, 11: 383–390
- Davidovici BB, Sattar N, Prinz CJ, Puig L, Emery P, Barker JN, van de Kerkhof P, Stahle M, Nestle FO, Girolomoni G, Krueger JG (2010): "Psoriasis and Systemic Inflammatory Diseases: Potential Mechanistic Links between Skin Disease and Co-Morbid Conditions" In: *Journal of Investigative Dermatology* 2010, 130: 1785–1796

-
- Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G (2013): "Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein." In: *Frontiers in Immunology* 2013, 4: Article 289
- Dirschka TD, Hartwig R, Oster-Schmidt C (2011): „Klinikleitfaden Dermatologie“, 3. Auflage, Urban und Fischer Verlag, München
- Duffy DL, Spelman LS, Martin NG (1993): "Psoriasis in Australian twins." In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993, 29: 428–434
- Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, Bergstralh DT, Jarvis GA, Sparling PF, Ting JP (2009): „Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signalling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome.“ In: *J Immunol* 2009, 182: 6460–6469
- Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, Voorhees JJ, Abecasis GR, Nair RP (2010): "Molecular Dissection of Psoriasis: Integrating Genetics and Biology" In: *Journal of Investigative Dermatology* 2010, 130: 1213-1226
- Engvall E & Perlman P (1971): "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." In: *Immunochemistry* 1971 8(9): 871–874
- Estler CJ, Schmidt H, Hirschhausen E (2006): "Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis." 6. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F (2012): "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodelling." In: *J. Clin. Investig.* 2012, 119: 3573–3585
- Farber EM, Nall ML, Watson W (1974): "Natural history of psoriasis in 61 twin pairs." *Arch. Dermatol.* 1974, 109: 207–211
- Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD (2007): "The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 beta by keratinocytes." *Curr Biol* 2007, 17: 1140–1145
- Fronzes R, Schäfer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G (2009): "Structure of a type IV secretion system core complex." In: *Science* 2009, 323(5911): 266-268.
- Fry L, Baker BS (2007): „Triggering psoriasis: the role of infections and medications.“ In: *Clin Dermatol* 2007, 25: 606–615
- Fuchs G (2007): "Allgemeine Mikrobiologie" 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Gangemi S, Merendino RA, Guarneri F, Minciullo PL, DiLorenzo G, Pacor M, Cannavo SP (2003): "Serum levels of interleukin-18 and s-ICAM-1 in patients affected by psoriasis: preliminary considerations." In: *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003, 17: 42–46
- Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M (2009): "Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8." In: *J Exp Med* 2009, 206: 1983-1994
- Gerabek WE, Haage BD, Keil G, Wegner W (2007): „Enzyklopädie Medizin-geschichte“ Band 3 O-Z, Walter de Gruyter, Berlin
- Gerdes S, Mrowietz U (2012): „Comorbidities and psoriasis. Impact on clinical practice“ In: *Hautarzt* 2012, 63: 202–213
- Gewirtz AT (2006): „Flag in the crossroads: flagellin modulates innate and adaptive immunity.“ In: *Curr Opin Gastroenterol* 2006, 22: 8–12
- Gilliet M, Lande R. (2008): "Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation." *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20: 401–407
- Greer S, Honeywell R, Geletu M, Arulanandam R, Raptis L (2010): "Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells." In: *J Immunol Methods* 2010, 15; 355(1-2): 76-79
- Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V et al (2009): „Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence.“ In: *Nature* 2009, 459: 433–436
- Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997): „Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme.“ In: *Science* 1997, 275: 206–209
- Gubler U & Hoffman BJ (1983): "A simple and very efficient method for generating cDNA libraries." In: *Gene* 1983, 25 (2-3): 263–269
- Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H (2003): „Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study“ In: *Br. J. Dermatol.* 2003, 149 (3): 530-534.
- Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG (2006): „Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival.“ *Cell* 2006, 126: 1135–1145

-
- Harder J, Nunez G (2009): "Functional Expression of the Intracellular Pattern Recognition Receptor NOD1 in Human Keratinocytes." In: *J Invest Dermatol* 2009, 129: 1299–1302
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001): "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." In: *Nature* 2001, 410(6832): 1099-1103
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): "Real time quantitative PCR." In: *Genome Res.* 1996, 6(10): 986-994
- Henseler T, Christophers E (1995): "Disease concomitance in psoriasis." In: *J Am Acad Dermatol* 32: 982–986
- Henseler T, Christophers E (1985): "Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris." In: *J Am Acad Dermatol* 13: 450-456
- Herdegen T et al. (2013): "Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie" 3. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Himmerich H, Bartsch S, Hamer H, Mergl R, Schönherr J, Petersein C, Munzer A, Kirkby KC, Bauer K, Sack U (2014): „Modulation of cytokine production by drugs with antiepileptic or mood stabilizer properties in anti-CD3- and anti-CD40-stimulated blood in vitro.“ In: *Oxid Med Cell Longev* 2014: 806162
- Hurgin V, Novick D, Rubinstein M (2002): "The promoter of IL-18 binding protein: activation by an IFN-gamma-induced complex of IFN regulatory factor 1 and CCAAT/ enhancer binding protein beta." In: *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 16957–16962
- Johansen C, Moeller K, Kragballe K, Iversen L (2007): "The activity of caspase-1 is increased in lesional psoriatic epidermis." In: *J Invest Dermatol* 2007, 127: 2857–2864
- Kanda N, Shimizu T, Tada Y, Watanabe S (2007): "IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes." In: *Eur J Immunol* 2007, 37: 338–350
- Karvonen SL, Korkiamäki T, Ylä-Outinen H, Nissinen M, Teerikangas H, Pummi K, Karvonen J, Peltonen J (2000): "Psoriasis and Altered Calcium Metabolism: Downregulated Capacitative Calcium Influx and Defective Calcium-Mediated Cell Signalling in Cultured Psoriatic Keratinocytes" In: *Journal of Investigative Dermatology* 2000, 114: 693–700

- Knijff EM, Kupka RW, Ruwhof C (2005): "Evidence that the immunopathogenic mechanism of lithium induced psoriasis differs from that of regular psoriasis." In: *Bipolar Disord* 2005, 7: 388-389
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM (1992): "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." In: *Science* 1992, 258 (5089): 1798-1801
- Koebner H (1876): „Zur Aetiologie der Psoriasis.“ In: *Viertelj Derm Syph* 8: 559-561
- Kogoj F (1938): „Zur Aetiologie der Psoriasis.“ In: *Dermatol Wochenzeitschrift* 1938, 51: 1485-1487
- Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T, Nakasone N, Suzuki T (2011): "Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection." In: *Cell Microbiol.* 2012, 14(2): 149-154
- Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J, Bauer S, Jakob T, Mempel M, Ollert M (2005): "Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes." In: *Immunology* 2005, 114(4): 531-541
- Lacy P, Stow JL (2011): "Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways." In: *Blood* 2011, 118: 9–18
- Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, Chamilos G, Feldmeyer L, Marinari B, Chon S, Vence L, Ricciari V, Guillaume P, Navarini A A, Romero P, Costanzo A, Piccolella E, Gilliet M, Frasca L (2014): "The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis." In: *Nat Commun.* 2014, 5: 5621
- Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO (2007): "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." In: *Nature* 2007, 449: 564-569
- Landriscina A & Friedman AJ (2016): „Integrating lifestyle-focused approaches into psoriasis care: improving patient outcomes?“ In: *Psoriasis (Auckl)* 2016, 19(6): 1-5
- Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, de Jong EC (2007): "Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9." In: *J Invest Dermatol.* 2007, 127(2): 331-341
- Li FL, Li X, Wang YF, Xiao XL, Xu R, Chen J, Fan B, Xu WB, Geng L, Li B (2012): "Astragaloside IV Downregulates β -Catenin in Rat Keratinocytes to Counter LiCl-Induced Inhibition of Proliferation and Migration." In: *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, 956107: 12

- Lin J & Redies C (2012): "Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression." In: *Dev Genes Evol.* 2012, 222(6): 369-376
- Lindegard B (1986): "Diseases associated with psoriasis in a general population of 159200 middle-aged, urban, native Swedes." In: *Dermatologica.* 1986, 172(6): 298-304
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." In: *Methods.* 2001, 25(4): 402-408
- Lowes MA, Suarez-Farinas M, Krueger JG (2014): "Immunology of Psoriasis" In: *Annu. Rev. Immunol.* 2014, 32: 227–255
- Maes M, Song C, Lin AH, Pioli R, Kenis G, Kubera M, Bosmans E (1999): „In vitro immunoregulatory effects of lithium in healthy volunteers.“ In: *Psychopharmacology* 1999, 143: 401-407
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009): "The inflammasomes guardians of the body." In: *Annu Rev Immunol* 2009, 27: 229–265
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002): "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." In: *Mol Cell* 10 (2): 417–426
- May A et al. (2012): "Langfassung der Leitlinie "Clusterkopfschmerz und trigemino-autonome Kopfschmerzen", Deutsche Gesellschaft für Neurologie, <http://www.awmf.org>, AWMF-Registernummer: 030/036
- McDermott PF, Ciacci-Woolwine F, Snipes JA, Mizel SB (2000): „High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation.“ In: *Infect Immun* 2000, 68: 5525–5529
- Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD (2003): „The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells.“ In: *J Immunol* 2003, 170: 5165–5175
- Menon GK, Elias PM (1991): "Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis." In: *Arch Dermatol.* 1991, 127(1): 57-63
- Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A (2007): "TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system" In: *Semin. Immunopathol.*, 2007, 29: 275–288

- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A (2006): "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf" In: *Nat. Immunol.*, 2006, 7: 569–575
- Mrowietz U, Schmitt-Ott G (2012): „Schuppenflechte“ 3. Auflage, S. Karger GmbH, Freiburg
- Mrowietz U, Reich K (2009): „Psoriasis - New Insights Into Pathogenesis and Treatment" In: *Deutsches Ärzteblatt Int* 106 (1–2): 11–9
- Mrowietz U, Elder JT, Barker J (2006): " The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients" In: *Arch Dermatol Res* 2006, 298: 309–319
- Muhl H, Kampfer H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J (2000): "Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in non leukocytic cells." In: *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 267: 960–963
- Munro WJ (1898): „Note sur l’histopathologie du psoriasis.“ In: *Ann Derm Syph* 1898, 9: 961-967
- Murphy M, Kerr P, Grant-Kels JM (2007): “The histopathologic spectrum of psoriasis" In: *Clinics in Dermatology* 2007, 25/6: 524–528
- Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J (2008): „The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response.“ In: *Nature* 452: 103–107
- Naik SM, Cannon G, Burbach GJ, Singh SR, Swerlick RA, Wilcox JN (1999): "Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene." In: *J Invest Dermatol* 1999, 113: 766–772
- Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D (2009): "Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways." In: *Nat Genet* 2009, 41: 199–204
- Nakamura K, Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tamura T (1993): "Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production." In: *Infect Immun.* 1993, 61(1): 64-70
- Naldi L, 2016: „Psoriasis and smoking: links and risks“ In: *Psoriasis (Auckl)* 2016, 27(6): 65-71

- Nijnik A, Pistollic J, Filewod NC, Hancock RE (2012): "Signalling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin." In: *J Innate Immun.* 2012, 4(4): 377-386
- Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2005): „The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes.“ In: *J Immunol.* 2005, 175(3): 1776-1784
- Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M (2008): "Th17cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways." In: *Br. J. Dermatol.* 2008, 159: 1086-1091
- Novick D, Schwartsburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z (2001): "A novel IL- 18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18." In: *Cytokine* 2001, 14: 334–342
- Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M (1999): "Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response." In: *Immunity* 1999, 10: 127–136
- Ockenfels HM, Wagner SM, Keim-Mass C (1996): "Lithium and psoriasis: cytokine modulation of cultured lymphocytes and psoriatic keratinocytes by lithium." In: *Arch Dermatol Res* 1996, 288: 173-178
- Ockenfels HM, Nussbaum G, Schultewolter T, Mertins K, Wagner SN, Goos M (1995): "Tyrosine phosphorylation in psoriatic T cells is modulated by drugs that induce or improve psoriasis." In: *Dermatology* 1995, 191(3): 217-225
- Ohta Y, Hamada Y, Katsuoka K (2001): "Expression of IL-18 in psoriasis." In: *Arch Dermatol Res* 2001, 293: 334–342
- Okayama H, Berg P (1982): "High-efficiency cloning of full-length cDNA." In: *Molecular and cellular biology* 1982, 2(2): 161-170
- Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, Kurokawa I, Gabazza EC, Tsutsui H, Katayama N (2010): "Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme." In: *J Dermatol Sci* 2010, 59: 129–135
- Omoto Y, Tokime K, Yamanaka K, Habe K, Morioka T, Kurokawa I, Tsutsui H, Yamanishi K, Nakanishi K, Mizutani H (2006): "Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment." In: *J Immunol* 2006, 177: 8315–8319

- O'Neill LA, Greene C (1998): "Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signalling machinery in mammals, insects, and plants." In: *J Leukoc Biol.* 1998, 63(6): 650-657
- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY (2002): "Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis." In: *N Engl J Med.* 2002, 347(15): 1151-1160
- Pascoe VL, Kimball A (2015): „Seasonal variation of acne and psoriasis: A 3-year study using the Physician Global Assessment severity scale.“ In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 2015, 73(3): 523-525
- Petersein C, Sack U, Mergl R, Schönherr J, Schmidt FM, Lichtblau N, Kirkby KC, Bauer K, Himmerich H (2015): "Impact of lithium alone and in combination with antidepressants on cytokine production in vitro." In: *J Neural Transm.* 2015, 122(1): 109-122
- Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA (1999): "Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse" In: *Natl Acad Sci USA* 1999, 96/5: 2256-2261
- Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer Jr. AB, Reboussin DM (1999): "Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases" In: *J Am Acad Dermatol* 1999, 41 (3 Pt 1): 401-407
- Rinnerthaler M, Streubel MK, Bischof J, Richter K (2014): "Skin aging, gene expression and calcium." In: *Exp Gerontol.* 26.09.2014 (Epub ahead of print)
- Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ (1972): "Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis." In: *N Engl J Med* 1972, 287: 738-743
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989): "Molecular cloning. A laboratory manual." In: Cold Spring Harb Laboratory Press, New York, 1989.
- Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Akira S, Núñez G, Gewirtz AT (2009): "Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity." In: *Eur J Immunol.* 2009, 39(2): 359-371
- Schroder K, Tschopp J (2010): "The inflammasomes." In: *Cell* 2010, 140(6): 821-832
- Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MCI (2013): "IL-18 in inflammatory and autoimmune disease" In: *Cell. Mol. Life Sci* 2013, 70: 4795-4808
- Skoven I, Thormann J (1979): "Lithium compound treatment and psoriasis." In: *Arch Dermatol.* 1979, 115(10): 1185-1187

- Snast I, Reiter O, Atzmony L, Leshem YA, Hodak E, Mimouni D, Pavlovsky L (2017): „Psychological stress and psoriasis. A systematic review and meta-analysis.“ In: *Br J Dermatol.* 2017, 9
- Sohn S, Schoeffski O, Prinz J, Reich K, Schubert E, Waldorf K, Augustin M (2006): “Cost of moderate to severe plaque Psoriasis in Germany: A Multicenter Cost-of-Illness Study” In: *Dermatology* 2006, 212: 137-144
- Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC (2003): „Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation.“ In: *J Immunol* 2003, 171: 6154–6163
- Stern RS, Nijsten T, Feldman SR, Margolis DJ, Rolstad T (2004): "Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction." In: *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004, 9(2): 136–139
- Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, Hanzawa K, Kumagai K, Okamura H, Takada H (2001): "Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells." In: *J Immunol* 2001, 167: 6568–6575
- Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen R, Julin M (1980): „Psoriasis and HLA-Cw6.“ In: *Br J Dermatol* 1980, 102: 179-184
- Tsankov N, Angelova I, Kazandjeva J (2000): "Drug induced psoriasis: recognition and management." In: *Am J Clin Dermatol* 2000, 1: 159-165
- Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, et al. (2012): "Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity." In: *Nat. Genet.* 2012, 44: 1341–1348
- Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K (2000): "Pathophysiological roles of interleukin-18 inflammatory liver diseases." In: *ImmunolRev* 2000, 174: 192–209
- Van Weemen BK & Schuurs AH (1971): "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." In: *FEBS Letters* 1971, 15(3): 232–236
- Watad A, Azrielant S, Bragazzi NL, Sharif K, David P, Katz I, Aljadeff G, Quaresma M, Tanay G, Adawi M, Amital H, Shoenfeld Y (2017): “Seasonality and autoimmune diseases: The contribution of the four seasons to the mosaic of autoimmunity.“ In: *J Autoimmun.* 2017, 82: 13-30

- Welch BL (1947): "The generalization of "Student's" problem when several different population variances are involved" In: *Biometrika* 1947, 34 (1–2): 28–35
- Willan R (1796-1808): „Description and Treatment of Cutaneous Diseases.“, Vol. 1, 152-188, J. Johnson, London
- Yan D, Afifi L, Jeon C, Cordoro KM, Liao W (2017): “A cross-sectional study of psoriasis triggers among different ethno-racial groups“ In: *J Am Acad Dermatol* 2017, 77/4: 756
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T (1998): "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production" In: *J. Immunol.* 1998, 161: 3400–3407

8. Anhang

Material	Hersteller
0,1M Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
5x First stand buffer	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
6-Loch-Zellkulturplatte	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
10mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
20G-Kanüle, Microlance 3	BD (Heidelberg, Deutschland)
Blocking Buffer	eBioscience (Wien, Österreich)
Chloroform	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chromogenen Substratlösung, eBioscience TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) ELISA Substrate Solution	eBioscience (Wien, Österreich)
Eppendorf Safe-Lock Tubes®	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ethanol, 75%-Ethanol / 25% Diethylpyrocarbonate-Wasser (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Flagellin	Pseudomonas aeruginosa, ATCC Stamm 33354, Dr. U. Gerstel (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Campus Kiel, Deutschland)
Streptavidin-Horseradish peroxidase	eBioscience (Wien, Österreich)
Human IL18 Standard	eBioscience (Wien, Österreich)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Lithium Chlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tab. 5: Alphabetische Auflistung der Materialien, die bei den Versuchen in dieser Dissertation zur Anwendung kamen.

Material	Hersteller
Normale humane epidermale Keratinozyten, Normal human epidermal keratinocytes	Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)
Oligoprimer, Oligo d(T) 18 Primer 20 µM	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Phosphate buffered saline	PAA Laboratories (Pasching, Deutschland)
Primäre Antikörper, <i>capture / coating antibody</i> , Human IL-18 Module Set ELISA	eBioscience (Wien, Österreich)
Primer HPRT forward	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Primer HPRT reverse	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Primer, GAPDH, GA forward	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Primer, GAPDH, GA reverse	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Primer, IL-18, IL-18 forward	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Primer, IL-18, IL-18 reverse	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNase freies Wasser, Gibco Distilled Water	ThermoFisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Reversen Transkriptase, Superscript 2 Reverse Transkriptase, 200U/µl	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Sample Diluent	eBioscience (Wien, Österreich)
Sekundäre Antikörper, detection antibody, Biotin-Conjugate	eBioscience (Wien, Österreich)
Stop Solution	eBioscience (Wien, Österreich)
Taq-DNA-Polymerase mit SYBR-Green-I-DNA-Farbstoff, SYBR <i>Premix Ex Taq</i> II	Takara Bio (Otsu, Japan)

Tab. 5: Alphabetische Auflistung der Materialien, die bei den Versuchen in dieser Dissertation zur Anwendung kamen (Fortsetzung).

Material	Hersteller
Trägerplatte, Eppendorf Assay Microplates 96	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Trizol, Trizol Reagent	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin-Lösung, 0,04% Trypsin / 0,03% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)
Trypsin Inhibitor Lösung, Trypsin Inhibitor Solution	Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)
Wash Buffer	eBioscience (Wien, Österreich)
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturmedium, Keratinocytes Growth Medium 2 Kit	Promo Cell (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifugenröhre, 50ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Tab. 5: Alphabetische Auflistung der Materialien, die bei den Versuchen in dieser Dissertation zur Anwendung kamen (Fortsetzung).

Gerätebezeichnung / Software	Hersteller
Open Office Calc 4.0.1.	Apache Software Foundation (Delaware, USA)
Eppendorf Microcentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Light-Cycler	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Nano Drop 1000	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Photometer	Tecan Sunrise (Männedorf, Schweiz)
Thermocycler, Trio-Thermoblock	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer Improved (Lancing, England)

Tab. 6: Alphabetische Auflistung aller Apparate und Software, die beim Entstehen dieser Dissertation zur Anwendung kamen.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, Direktor der Universitäts-Hautklinik Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz, der mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gab und darüber hinaus immer motiviert mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Harder für die Nutzung seiner Instrumente und die zahlreichen Anregungen.

Paola Di Meglio danke ich für viele praktische Tricks und Kniffe in der Laborarbeit.

Dr. Ulrich Gerstel danke ich für die Bereitstellung des Flagellins.

Lisa Marie Philipp, Cornelia Wilgus, Heilwig Hinrichs gilt mein Dank für die technische Unterstützung bei der Umsetzung meiner Versuche.

Für die herzliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit möchte ich dem Team des Psoriasis-Zentrums danken.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden für die vielfältige Unterstützung während dieser Zeit.