

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. S. Weidinger)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zum Einfluss von RNase 7 auf
kutane RNA-induzierte Entzündungsreaktionen**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Annika Scheel

aus Herne

Kiel, 2025

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Harder

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Laudien

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.05.2025

gez.: Prof. Dr. Robert Häsler

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I-III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV-V
1. Einleitung	1
1.1 Die Haut.....	1
1.2 Antimikrobielle Peptide und deren Bedeutung für die menschliche Haut	2
1.3 Ribonuklease 7	3
1.4 Atopische Dermatitis	5
1.5 Ribonukleaseinhibitor	6
1.6 Der mögliche Einfluss freier DNA auf Entzündungsprozesse der Haut.....	7
1.7 Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly(I:C))	9
1.8 Thymic stromal lymphopoietin (TSLP).....	9
2. Zielsetzung.....	10
3. Material und Methoden.....	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Geräte	13
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.4 Lösungen/ Puffer/ Medien.....	17
3.1.5 Antikörper	19
3.1.6 Sonstige Agenzien.....	19
3.1.7 Oligonukleotide.....	20
3.1.8 Humane Zellen	22
3.1.9 Software	22
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Zell- und mikrobiologische Methoden	23
3.2.1.1 Kultivierung humaner Keratinozyten	23
3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen	24
3.2.1.3 Stimulation von Keratinozyten	24

3.2.1.4	Transiente Transfektion mit Keratinozyten.....	24
3.2.2	Proteinnachweisverfahren	25
3.2.2.1	Sandwich-ELISA.....	25
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	26
3.2.3.1	RNA Isolation	26
3.2.3.2	Erststrang-cDNA-Synthese.....	26
3.2.3.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	27
3.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
3.2.3.5	RNase Assay mit fluoreszierendem Substrat.....	29
3.2.4	Graphische Darstellung und Analyse der Ergebnisse	30
4.	Ergebnisse	31
4.1	Versuche zur Konzentrationskinetik	31
4.1.1	TSLP-I und TSLP-s.....	31
4.1.2	TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17c.....	33
4.2	Versuche zur Zeitkinetik mit und ohne IL-4 und IL-13.....	34
4.2.1	TSLP-I	34
4.2.2	TNF- α	39
4.3	Stimulationen mit rekombinanter RNase 7	42
4.4	siRNA Versuche.....	45
4.4.1	R7-siRNA	45
4.4.2	RI-siRNA	47
4.5	RNase 7 Assays	49
5.	Diskussion.....	52
5.1	Freie RNA steigert die Höhe von kutanen Entzündungsantworten	52
5.2	Zeitlicher Ablauf von kutanen Entzündungsantworten.....	54
5.3	Ein atopisches Zytokinmilieu verstärkt die Entzündungsantwort von Keratinozyten	56
5.4	RNase 7 nimmt durch Ribonukleaseaktivität Einfluss auf kutane Entzündungsprozesse	58
5.5	Sowohl der RI als auch freie DNA verursachen eine Abschwächung der Ribonukleaseaktivität von RNase 7.....	59

6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	66
8.	Abbildungsverzeichnis	70
9.	Erklärung	72
10.	Danksagung	73
11.	Akademischer Lebenslauf	74
12.	Veröffentlichungen	75

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
° C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
AD	Atopische Dermatitis
AMP	Antimikrobielle Peptide
β	Beta
bzw.	beziehungsweise
cDNA	“complementary DNA” = komplementäre DNA
CFU	“colony-forming units” = koloniebildende Einheit
DNA	“desoxyribonucleic acid” = Desoxyribonukleinsäure
ELISA	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
et al.	<i>Et alii</i> = und andere
h	Stunde
IL	Interleukin
KGM	“keratinocyte growth medium”
M	Molar (mol/l)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PCR	“Polymerase chain reaction” = Polymerase-Kettenreaktion
P/S	Penicillin/Streptomycin
Poly(I:C)	Polyinosine-polyxytidylic acid
Rek.	Rekombinant
RI	Ribonukleaseinhibitor

RNA	“Ribonucleic acid” = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP38	Ribosomales Protein L38
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
T/E	Trypsin/ EDTA
T-Zellen	Thymus-Zellen
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TSLP-l	Thymic stromal lymphopoietin, lange Form
TSLP-s	Thymic stromal lymphopoietin, kurze Form
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser (destilliertes Wasser)
Vgl.	Vergleiche
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin

1. Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers (Niyonsaba et al., 2017). Sie ist in verschiedenen Schichten aufgebaut und verfügt über Sinnes-, Kontakt- und Schutzfunktionen. Von innen nach außen besteht sie aus Subkutis, dermoepidermalen Junktionszone und Kutis. Die Kutis wiederum ist von innen nach außen aus Dermis und Epidermis aufgebaut. In der Dermis finden sich die *Strata reticulare* und *papillare*, in der Epidermis die *Strata basale*, *spinosum*, *granulosum*, *lucidum* (diese ist nur in der Leistenhaut sichtbar) und *corneum*.

Die basale Schicht der Epidermis zeichnet sich unter anderem durch die mitotisch aktiven Keratinozyten aus. Hier finden sich auch epidermale Stammzellen, sich amplifizierende Zellen sowie postmitotische Zellen als Ausdruck einer frühen Differenzierung (Wikramanayake et al., 2014). Die sich hier befindlichen Keratinozyten trennen sich von dem *Stratum basale* und durchlaufen einen Differenzierungsprozess. In dem auf das *Stratum basale* folgenden *Stratum spinosum* verlassen die Keratinozyten den Zellzyklus. Des Weiteren erfolgt eine Verstärkung des Zytoskeletts, um vor physikalischen Traumen geschützt zu sein. Im *Stratum granulosum* kommt es im Anschluss zu einer Lipid-Verdrängung sowie der Expression späterer Differenzierungsmarker (z.B. Filaggrin & Loricrin). Im Folgenden kommt es im *Stratum corneum* zur vollständigen Kornifizierung der Zellen und zur Desquamation der toten Keratinozyten (Denecker et al., 2008; Rademacher, 2018). Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte, schematische Darstellung des Aufbaus der Epidermis.

Die Haut schützt den Organismus gegen externe physikalische, chemische und biologische Einflüsse wie Verletzungen, UV-Strahlungen und Mikroorganismen. Des Weiteren stellt sie eine wasserundurchlässige Barriere dar, welche den Organismus vor einer eventuellen Austrocknung bewahrt (Denecker et al., 2008). Mit ihrer physikalischen und chemischen Barriere ist sie somit die erste Abwehr des menschlichen Körpers (Niyonsaba et al., 2017; Wikramanayake et al., 2014).

Die Forschung der vergangenen Jahrzehnte hat gezeigt, dass die sogenannten Antimikrobiellen Peptide (AMP) eine zentrale Rolle bei der Abwehrfunktion der Haut einnehmen.

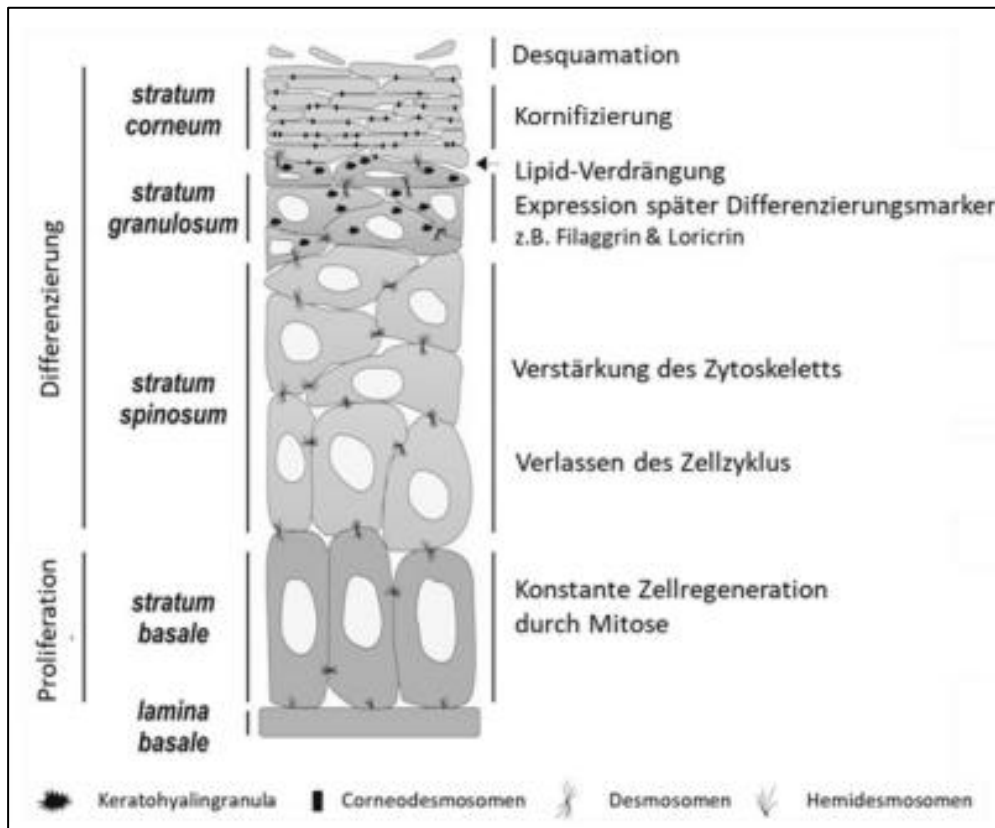


Abbildung 1: Aufbau der Epidermis; aus (Rademacher, 2018), modifiziert nach (Denecker et al., 2008)

1.2 Antimikrobielle Peptide und deren Bedeutung für die menschliche Haut

Antimikrobielle Peptide und Proteine repräsentieren eine vielfältige Gruppe kleiner, meist kationischer endogener Proteine (Adase et al., 2016; Harder et al., 2010). Diese sind antimikrobiell aktiv gegen Bakterien, Viren und Pilze.

Bislang wurden etwa 3560 AMP im Tier- und Pflanzenreich identifiziert, jährlich kommen etwa 100 hinzu. Die Vielzahl der AMP hat dazu geführt, dass seit 2003 eine AMP Online-Datenbank (<http://aps.unmc.edu/AP/>) existiert (Melo et al., 2009; Wang, 2020).

Intensive Forschungen haben gezeigt, dass menschliche Haut und andere epitheliale Gewebe ebenso wie viele Leukozyten eine Vielfalt an AMP produzieren können. Viele dieser AMP spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr der Haut (Harder et al., 2010).

Die AMP der Haut werden produziert von Keratinozyten, Sebozyten (Talgdrüsenzellen), Thymus-Zellen (T-Zellen) und Mastzellen. Zum Teil werden sie konstitutiv gebildet, zum Teil sind sie durch Infektionen, Verletzungen und Entzündungen induzierbar, z.B. durch entzündliche Zytokine wie TNF- α (Harder et al., 2010). Diese Tatsache bedingt ihre Zugehörigkeit sowohl zur angeborenen als auch zur erworbenen Immunabwehr.

Neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften weisen AMP auch immunmodulatorische Eigenschaften auf. Beispiele hierfür sind die Induktion von T-Zellen, die Migration, Proliferation und Differenzierung sowie die Regulierung der Zytokin-/ Chemokinproduktion, das Anregen von Angiogenese und Wundheilung sowie die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut (Niyonsaba et al., 2017).

AMP beeinflussen außerdem zusammen mit Lipiden die Permeabilität der Haut. Sowohl AMP als auch Lipide werden in Granula (Lamellarkörperchen) gebündelt, welche von den Keratinozyten unterhalb des *Stratum corneum* gebildet worden sind. Kommt es zur Sekretion dieser Lamellarkörperchen, füllen diese freie Räume der Haut aus und schützen damit vor Mikroorganismen (Zasloff, 2009).

Zu der Gruppe der AMP zählen unter anderem Defensine, Cathelicidine, S100Proteine (z.B. Psoriasine), Dermcidine sowie Ribonukleasen (RNasen) (Niyonsaba et al., 2017).

1.3 Ribonuklease 7

RNasen sind hoch basische Proteine. Die menschliche Haut exprimiert die RNasen 1, 4, 5 und 7, wobei nur die RNasen 5 und 7 über antimikrobielle Aktivität *in vitro* verfügen (Zasloff, 2009).

Die RNase 7, welche 2002 erstmals von Schröder und Harder aus der Haut der Ferse gesunder Probanden isoliert worden ist, wird in hohen Mengen von der menschlichen Epidermis gebildet.

Die 2002 isolierten Extrakte besaßen antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* (Harder und Schröder, 2002). Darauf folgende Untersuchungen der antimikrobiellen Eigenschaften der RNase 7 *in vitro* zeigten, dass diese hohe antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie gegen *Candida albicans* aufweist (Adase et al., 2016; Rademacher, 2018). 2012 fanden Simanski *et al.* Hinweise darauf, dass die RNase 7 womöglich auch antimikrobielle Eigenschaften gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sowie Vancomycin-resistente *Enterokokken* (VRE) aufweist (Simanski et al., 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von RNase 7 in primären Keratinozyten durch proinflammatorische Zytokine und Infektionsstimuli induziert wird (Harder und Schröder, 2002; Rademacher et al., 2017).

RNase 7 ist ein Mitglied der RNase A Superfamilie, die 13 Gene auf Chromosom 14q11.2 umfasst (Abtin et al., 2009). Die RNase A Superfamilie A ist charakterisiert durch eine dreidimensionale Struktur mit Disulfidbrückenbindungen (Rademacher, 2018). Diese Superfamilie ist ausgesprochen dynamisch, da sie hohe Raten von Genduplikationen und Genverlusten aufweist. Diese Tatsache führt dazu, dass sie in variablen Zahlen von Genen in unterschiedlichen Spezies vertreten ist (Cho et al., 2005).

Neben der RNase 7 gehören ebenfalls die RNasen 2, 3, 5, und 8 zur RNase Superfamilie A, auch weisen sie ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften auf. Hier sieht man bereits Hinweise auf die Rolle der RNasen in der angeborenen Immunabwehr (Abtin et al., 2009).

Von den RNasen, welche von menschlichen Keratinozyten exprimiert werden, weist die RNase 7 die höchsten Konzentrationen in der Haut auf (Zasloff, 2009). Die mRNA von RNase 7 wird in vielen verschiedenen epithelialen Geweben exprimiert. Die höchsten Konzentrationen finden sich in der Haut, den Tonsillen, dem Pharynx und dem Urogenitalsystem. Im Urogenitaltrakt hilft die RNase 7 unter anderem dabei, die Sterilität aufrecht zu erhalten (Becknell et al., 2015). In der Haut ist die Konzentration der RNase 7 im *Stratum corneum* am höchsten. Die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 ermöglicht hier eine Degradation der RNA, wobei die antibakterielle Aktivität von der RNase 7 unabhängig von der Ribonukleaseaktivität ist (Simanski et al., 2012). Die Expression von RNase 7 kann durch proinflammatorische Zytokine und mikrobielle Stimuli induziert werden (Rademacher, 2018).

Um die Stimulierbarkeit der Expression von RNase 7 bestimmen zu können, maßen Harder *et al.* die Konzentrationen von RNase 7 mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) aus Hautspülungen von Patienten. Hierbei unterschieden sie Spülungen von unbeschädigter Haut sowie Spülungen von zuvor beschädigter Haut. Sie führten diese Spülungen nach einer Stunde sowie nach 24 Stunden durch und verglichen sie miteinander. Die Ergebnisse zeigten, dass bereits nach einer Stunde die Sekretion von RNase 7 von läsionaler Haut signifikant erhöht ist (Harder et al., 2010).

Kommt es zu einem Barrierschaden der menschlichen Haut, so wird ein Mechanismus aktiviert, welcher dazu führt, dass die gestörte Integrität der Hautbarriere innerhalb von Stunden wieder hergestellt wird: Reife Lamellarkörperchen wandern innerhalb kürzester Zeit in das *Stratum corneum* ein. Außerdem werden in einem langsameren Prozess Gene aktiviert, welche für die Bestandteile der Lamellarkörperchen kodieren, AMP und Proteine eingeschlossen (Zasloff, 2009). Es ist bekannt, dass die AMP der Haut in allen Stadien der Wundheilung hochreguliert sind (Niyonsaba et al., 2017). In dieser Tatsache ist die Forschung an AMP in Zusammenhang mit Erkrankungen begründet, welche charakteristischerweise Hautschäden aufweisen.

1.4 Atopische Dermatitis

Die beiden chronischen Hauterkrankungen Atopische Dermatitis (AD) und Psoriasis sind charakterisiert durch eine gestörte Barrierefunktion der Haut. Diese haben genetische und ökologische Komponenten wie eine gestörte Hautbarriere und Anomalien von Immunozyten (Harder et al., 2010). Im Gegensatz zur Haut von Patienten mit Psoriasis ist die Haut von Patienten mit Atopischer Dermatitis anfällig für Superinfektionen mit *Staphylococcus aureus* (Rademacher et al., 2016). Dies ist möglicherweise durch einen Überfluss an AMP auf der Haut von Patienten mit Psoriasis erklärbar (Harder et al., 2010).

Die entzündliche Hauterkrankung AD ist neben der Beeinträchtigung der Hautbarrierefunktion charakterisiert durch eine reduzierte Hydrierung der Haut und einer Dysfunktion der angeborenen Immunabwehr. Diese Dysfunktion wird u.a. mit *Staphylococcus aureus* Infektionen und anderen, viralen Infektionen assoziiert (Harder et al., 2010; Wikramanayake et al., 2014).

Die Haut von Patienten mit AD weist typischerweise eine höhere Konzentration von AMP auf als die Haut von gesunden Kontrollpatienten, jedoch eine niedrigere Konzentration als die Haut von Patienten mit Psoriasis (Harder et al., 2010; Niyonsaba et al., 2017). Die Induktion der AMP ist weniger stark ausgeprägt, möglicherweise auf Grund eines Mangels an Induktoren, wie z.B. den Interleukinen (IL): IL-1, IL-17 und IL-22. Eine weitere mögliche Ursache ist eine Unterdrückung der AMP-Induktion durch höhere Konzentrationen von TH2-Zytokinen wie z.B. IL-4 und IL-13. Zusammenfassend sind beide Hauterkrankungen durch eine erhöhte Proteinkonzentration der AMP RNase 7, Psoriasin, hBD-2 und hBD-3 charakterisiert (Abtin et al., 2009a; Harder et al., 2010).

Eine Genexpressionsstudie mit Hautbiopsien hat gezeigt, dass die Genexpression von RNase 7 auf läsionaler Haut von Patienten mit AD höher ist als auf nicht-läsionaler Haut von eben diesen Patienten. Dies lässt darauf schließen, dass die verminderte kutane Induktion von RNase 7 nicht mit AD assoziiert ist. Es lässt sich anhand dieser Studie jedoch nicht ausschließen, dass die RNase 7 auf der läsionalen Haut von Patienten mit AD nicht effizient Bakterien wie *Staphylococcus epidermidis* abtötet. Eine ineffiziente antimikrobielle Aktivität der RNase 7, welche in einer Inaktivierung der RNase 7 oder dem Verlust der antimikrobiellen Potenz durch Strukturveränderungen oder einer inadäquaten Mobilisierung begründet sein könnte, sind mögliche Erklärungen (Wikramanayake et al., 2014).

Sowohl die Ribonukleaseaktivität als auch die antimikrobielle Aktivität der RNasen 5 und 7 sind sensitiv auf den Ribonukleaseinhibitor (RI), welcher die Ribonukleaseaktivität blockiert. Die Interaktion zwischen der RNase 7 sowie dem RI könnte daher eine mögliche Ursache für eine ineffiziente antimikrobielle Aktivität der RNase 7 sein.

1.5 Ribonukleaseinhibitor

Der RI ist ein hufeisenförmiges, leucinreiches Protein. Er stellt 0,1 % der im Zytosol von Säugetieren vorkommenden Proteine dar. Die Keratinozyten der menschlichen Haut produzieren neben den RNasen 1, 4, 5 und 7 auch den RI. Dieser bindet eins zu eins mit einigen Mitgliedern der RNase A Superfamilie und inhibiert die enzymatische Aktivität einiger RNasen (Abtin et al., 2009).

Abtin *et al.* führten 2009 eine Vorinkubation von den RNasen 5 und 7 mit dem RI durch und konnten dadurch zeigen, dass die zuvor mit dem RI inkubierten RNasen eine schwächere antimikrobielle Aktivität aufweisen.

Auch zeigten Abtin *et al.* mittels Immunhistochemie, dass der RI im *Stratum corneum* nicht nachweisbar ist. Sie gelangten zu der Hypothese, dass der RI im *Stratum corneum* durch Proteasen abgebaut wird. Die zuvor im Komplex gebundenen und dadurch inaktivierten RNasen 5 und 7 würden als Folge freigesetzt werden und wieder antimikrobiell aktiv sein (Abtin *et al.*, 2009; Zasloff, 2009).

Durch diese Hypothese lässt sich jedoch noch nicht begründen, warum die Haut von Patienten mit AD unter anderem anfälliger für Superinfektionen mit *Staphylococcus aureus* ist (Rademacher *et al.*, 2016).

1.6 Der mögliche Einfluss freier DNA auf Entzündungsprozesse der Haut

Eine weitere Aufgabe von vielen hautassoziierten AMP ist die Aktivierung von Keratinozyten und Immunzellen zur Wahrnehmung extrazellulärer freier DNA. Die kationischen AMP bilden daraufhin Komplexe mit der negativ geladenen DNA, welche die Aufnahme durch Immunzellen und Keratinozyten vermitteln sowie die Aktivierung von DNA-Erkennungsrezeptoren verstärken (Kopfnagel *et al.*, 2021). Die Komplexbildung zwischen freier DNA und AMP sowie deren Einfluss auf das Immunsystem wurde 2007 erstmals von Lande *et al.* untersucht (Lande *et al.*, 2007). 2015 zeigten Lande *et al.* diesen Zusammenhang auch für die RNase 7 (Lande *et al.*, 2015). Kopfnagel *et al.* untersuchten in diesem Rahmen die möglichen Interaktionen zwischen freier DNA sowie der Wirkung von AMP (Kopfnagel *et al.*, 2021). Sie stellten die Hypothese auf, dass extrazelluläre DNA die antimikrobiellen Effekte von kationischen AMP mindert. Um dies zu evaluieren, haben sie unter anderem die Konzentrationen freier DNA auf läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Patienten mit AD gemessen. Sie konnten zeigen, dass die Konzentrationen freier DNA auf läsionaler Haut von AD Patienten signifikant höher ist als auf nicht-läsionaler Haut (Abb. 2).

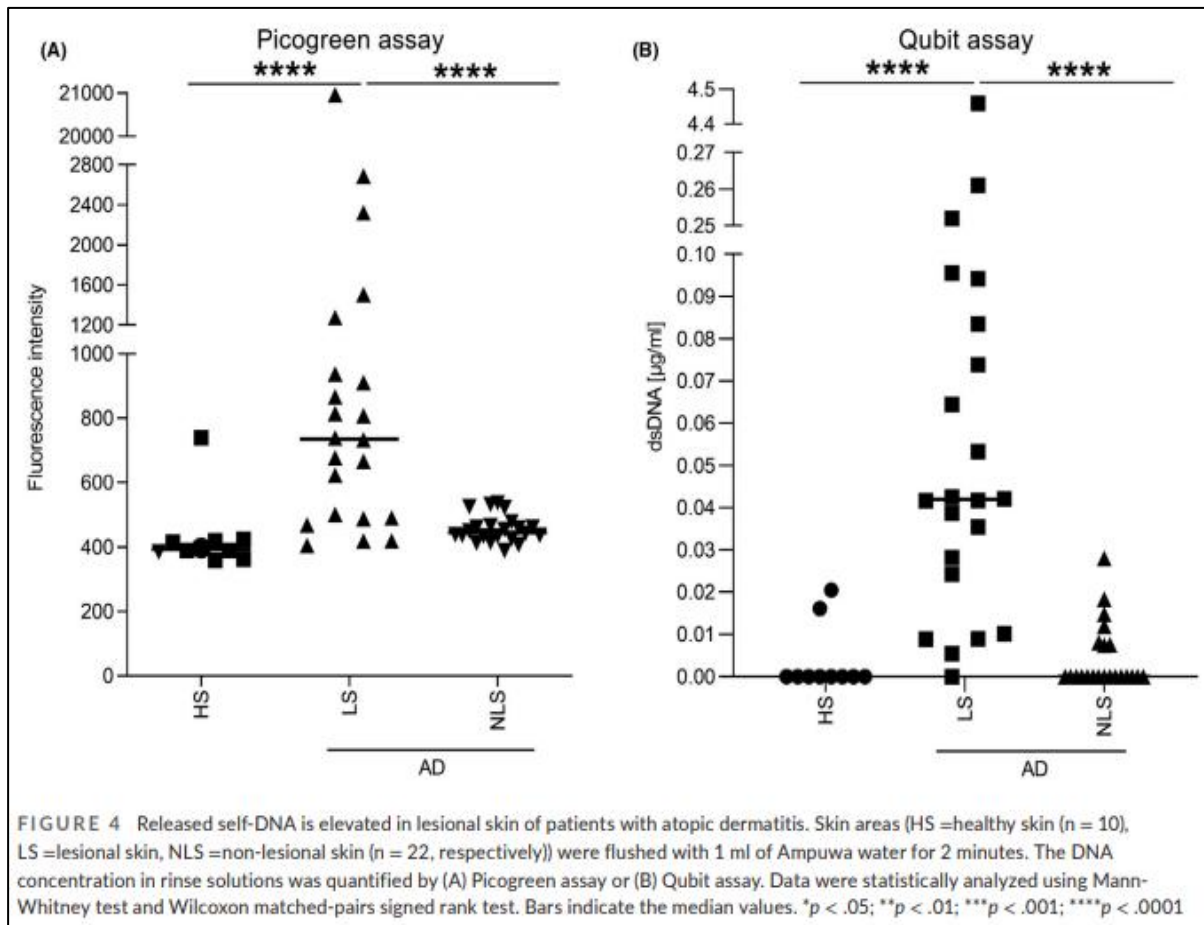


Abbildung 2: Die Konzentration freier DNA ist auf läsionaler Haut von Patienten mit AD höher als bei Kontrollpatienten, (Kopfnagel et al., 2021)

Zur weiteren Beurteilung der Interaktion zwischen freier DNA und AMP inkubierten Kopfnagel *et al.* *Staphylococcus aureus*-Kolonien mit AMP-Konzentrationen, von denen man wusste, dass sie signifikant Bakterien abtöten. Diese Inkubation führten sie sowohl mit als auch ohne Zugabe freier DNA durch. Die Bakterien wurden anschließend über Nacht auf einer Agarplatte kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) gezählt. Die Anzahl der CFU war von der am Vortag dazu gegebenen Konzentration der freien DNA abhängig. Bei hohen DNA-Konzentrationen war die Anzahl der CFU deutlich geringer als bei niedrigen DNA-Konzentrationen bzw. ohne Zugabe von DNA (Kopfnagel et al., 2021). Die Wirkung der freien DNA zeigte sich unabhängig von der Struktur der verschiedenen AMP sowie der Länge der DNA. Allerdings schien diese Wirkung nur bei kationischen AMP einzutreten.

Kopfnagel *et al.* stellten hier die Vermutung auf, dass die negativ geladene DNA die positive Ladung der AMP neutralisiert und dadurch die Bindung der Mikroorganismen verhindert.

1.7 Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly(I:C))

Um den Einfluss der Ribonukleaseaktivität von RNase 7 auf kutane Entzündungsreaktionen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Stimulationen mit Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly(I:C)) durchgeführt.

Bei Poly(I:C) handelt es sich um eine synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA. Es induziert unter anderem die TSLP-Produktion in Keratinozyten (Harada *et al.*, 2009; Kawasaki *et al.*, 2011). Die Stimulation von Keratinozyten mit Poly(I:C) führt zu einer mehr als zehnfach erhöhten Genexpression von TSLP sowie anderen Zytokinen und Chemokinen (Kinoshita *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010).

1.8 Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)

Das Ausmaß der durch Poly(I:C) bewirkten Entzündungsreaktionen wurde durch verschiedene Entzündungsparameter bestimmt. Hierbei wurde das Augenmerk auf TSLP gelegt. TSLP ist ein IL-7 ähnliches Zytokin. Es spielt eine Rolle bei allergischen Reaktionen und Entzündungen durch Aktivierung dendritischer Zellen. Diese führt zur Anregung der Differenzierung von T-Zellen zu T-Helferzellen (TH-Zellen). Eine Überexpression von TSLP wird vor allem in den Atemwegsepithelien bei Asthma bronchiale sowie in den Keratinozyten bei AD und Psoriasis beobachtet. Dabei korreliert die Höhe der Expression mit der Schwere der Erkrankung (Kawasaki *et al.*, 2011; Kinoshita *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010). So haben Kinoshita *et al.* 2009 gezeigt, dass Mäuse mit keratinozyten- oder lungenspezifischer TSLP-Überexpression einen AD- bzw. Asthma-ähnlichen Phänotyp aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse mit fehlendem oder mangelhaftem TSLP-Rezeptor eine deutlich schwächere Ausbildung von asthmaähnlichen Symptomen (Kinoshita *et al.*, 2009).

TSLP wirkt durch viele unterschiedliche Mechanismen auf die Entzündungsprozesse des menschlichen Körpers ein. Es hat eine synergistische Wirkung auf Mastzellen mit IL-1 und TNF- α zur Produktion von IL-5 und IL-13. Auch regt es die Proliferation von CD4-positiven T-Zellen an und aktiviert sowohl Langerhans-Zellen als auch dendritische Zellen. Letztere induzieren als Folge naive T-Zellen zur Differenzierung in TH-Zellen. Die TH-Zellen sezernieren daraufhin TH2-Zellen rekrutierende Chemokine (Kinoshita et al., 2009).

Harada *et al.* beschrieben 2009 erstmals, dass es zwei Varianten von TSLP gibt. Es werden eine kurze (TSLP-*short*, TSLP-s) und eine lange Form (TSLP-*long*, TSLP-l) unterschieden. Sie zeigten, dass die Stimulation mit Poly(I:C) in einer Induktion von TSLP-l, jedoch nicht in einer Induktion von TSLP-s, resultiert. TSLP-s wird konstitutionell im menschlichen Gewebe exprimiert und spielt hier eine homöostatische Rolle. Im Gegensatz dazu wird TSLP-l nur in geringeren Konzentrationen konstitutionell gebildet. Vielmehr kommt es zu einer Hochregulierung von TSLP-l bei entzündlichen Vorgängen, zum Beispiel bei AD und Asthma bronchiale (Harada et al., 2009; Varricchi et al., 2018).

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Ribonukleaseaktivität von RNase 7 auf RNA-vermittelte Entzündungsreaktionen der Haut zu untersuchen. Hierbei lag ein besonderes Augenmerk auf dem möglichen Einfluss auf die chronisch-entzündliche Hauterkrankung AD.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es bei einem Zellschaden der Keratinozyten zu einer Freisetzung von RNA sowie einer Induktion des AMP RNase 7 kommt. Die induzierte RNase 7 könnte durch ihre Ribonukleaseaktivität einen Teil der freigesetzten RNA degradieren. Dadurch würde die RNase 7 bewirken, dass die Entzündungsreaktion, welche unter anderem durch die freigesetzte RNA induziert wird, weniger stark ausfällt (Abb. 3). Um die Entzündungsreaktion quantifizieren zu können, wurden Messungen verschiedener proinflammatorischer Zytokine, insbesondere der langen Form vom *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP-l), genutzt.

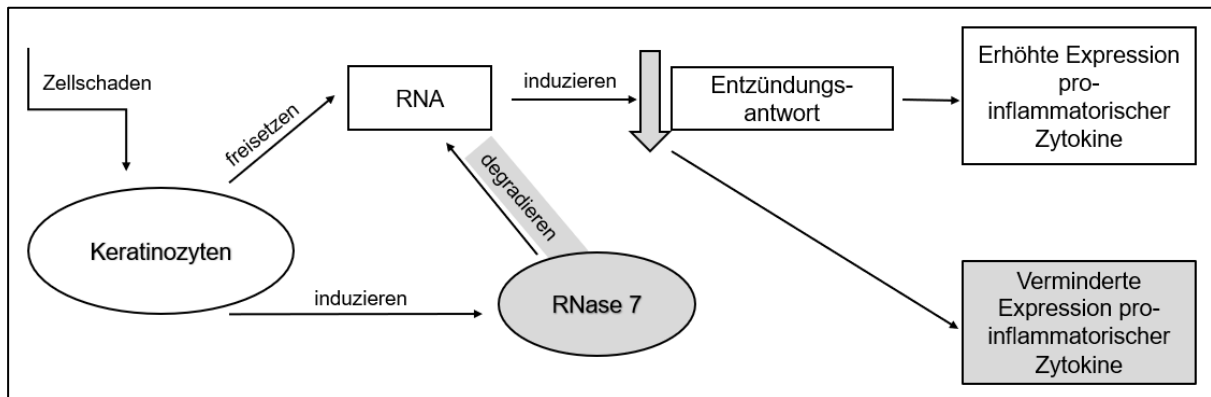


Abbildung 3: RNase 7 degradiert freie RNA und bewirkt dadurch eine Abschwächung der Entzündungsantwort

Im weiteren Verlauf wurde der Fokus auf die Interaktion zwischen der RNase 7 und dem RI gelegt. Hierbei wurde vermutet, dass die Bindung der RNase 7 durch den RI und die daraus resultierende geringere Konzentration der freien RNase 7 in einer verminderten Degradierung der RNA und somit in einer verstärkten Entzündungsantwort der Keratinozyten resultiert. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Blockade des RI eine verminderte Entzündungsantwort bewirkt (Abb. 4 und 5).

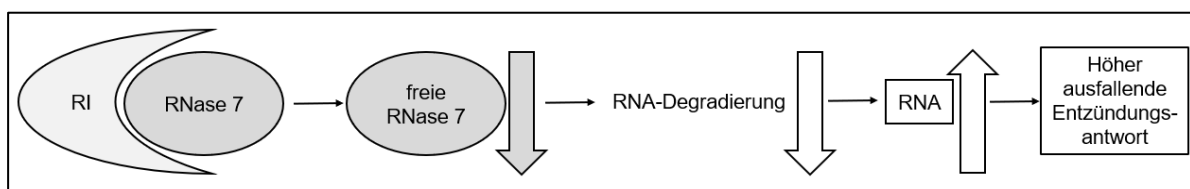


Abbildung 4: Die Bindung zwischen dem RI und der RNase 7 resultiert in einer höher ausfallenden Entzündungsantwort

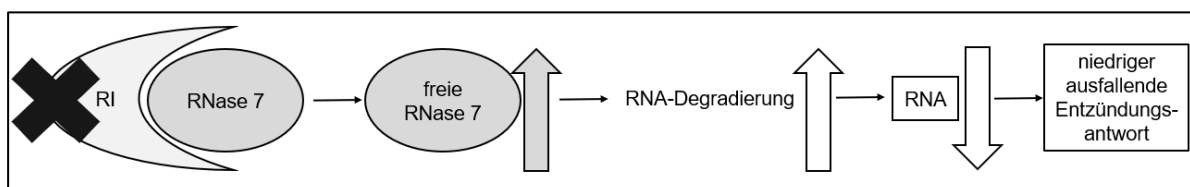


Abbildung 5: Bei Blockade des RI kann die freiwerdende RNase 7 RNA degradieren und somit Einfluss auf die Höhe der Entzündungsantwort nehmen

Abschließend wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit freie DNA die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 beeinflusst. Hier wurde angenommen, dass die Bindung der RNase 7 durch freie DNA, ähnlich zur Bindung zwischen der RNase 7 und dem RI, in einer geringeren Konzentration freier RNase 7 resultiert und dadurch wiederum weniger RNA degradiert werden kann. Auch hier müsste die Entzündungsantwort der Keratinozyten entsprechend höher ausfallen (Abb. 6).

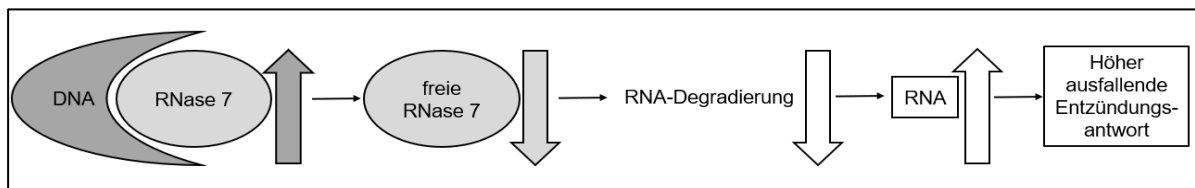


Abbildung 6: Die Bindung der RNase 7 durch freie DNA hindert die RNase 7 daran, RNA zu degradieren

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
CO ₂ Inkubatoren	Heraeus™ BB 16	Heraeus (Holding)
	Formascientific™ 3164	Thermo Scientific (Schwerte)
	CB 150I™	Binder (Tuttlingen)
Concentrator	5301	Eppendorf (Hamburg)
Flüssigkeits-Absaugsystem	BVC professional	Vacuubrand (Wertheim)
Flüssigstickstofftank	Arpege 70	Air Liquide (Düsseldorf)
Geldokumentation	UVP UV solo touch	Analytik (Jena)
Gelelektrophorese	Horizon 11-14	Life Technologies (Burladingen)
Mikroplattenreader	Sunrise™	Tecan (Crailsheim)
	Infinite MPlax	Tecan (Crailsheim)
Mikroplattenwasher	ELx50™	BioTek (Bad Friedrichshall)
Mikroskope	Leitz DiaVert™	Leica (Wetzlar)
	Wilovet™ 30	Hund (Wetzlar)
pH-Meter	pH 50+ DHS	Xs instruments (Carpi, Italien)
Photometer	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Peqlab (Karlsruhe)
Pipettierhilfen	Reference™ 2,5; 10; 100; 1000µl	Eppendorf (Hamburg)
	Research™ 2,5; 10; 100; 1000µl	Eppendorf (Hamburg)
Präzisionswaagen	KERN 822-33	Kern & Sohn (Balingen)
	Excellence XPR	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Real-Time PCR System	StepOne Plus™	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Sterilwerkbänke	Cytosafe™ 2004	Gelaire (Seven Hills, Australien)
	clanLAF™ VFR 1206 GS	Labogene (Lyngø, Dänemark)

Thermocycler	T3™	Biometra (Göttingen)
Thermoshaker	TS100	Biosan (Riga, Lettland)
Shaker	Titramax 100	Heidolph (Schwabach)
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik Janke & Kunkel (Staufen)
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad	1004	GFL (Burgwedel)
Wärmeschrank	ULE 400	Memmert (Schwabach)
Zentrifugen	Eppendorf 5810R, 5804R, 5424, 5415D, 5417R	Eppendorf (Hamburg)
	MegaStar 600R	VWR (Pennsylvania, USA)
	ReaxTop	Heidolph (Schwabach)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-, 12- und 24-Loch-Flachbodenplatten (unbeschichtet)	Corning (Kaiserslautern)
96-Loch-Flachbodenplatte (NUNC™)	Thermo Scientific (Schwerte)
Biopsiestanzen (3; 4; 5; 6 mm)	pfm medical (Köln)
DNA load bin Tubes 250safe-lock (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Folie für qPCR Platten	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
InnuSpeed Lysis Tube W	Analytik (Jena)
Kryo-Röhrchen (1,8 ml)	Nunc (Wiesbaden)
Mikro-Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (20; 100; 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen Filter Tip (20; 100; 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Probenröhrchen (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

qPCR 8er Deckel	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
qPCR 8er Streifen	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
qPCR 96-Well Flachbodenplatte halber Rahmen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhren (25; 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Einmalpipetten (2; 5; 10; 25; 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpelle (No. 11; 23)	pfm medical (Köln)
Spritzenvorsatzfilter (0,2; 0,45; 0,6 µm)	Roth (Karlsruhe)
Transferpipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Vernichtungsbeutel	Sarstedt (Nümbrecht)
Wägeschalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (T25; T75)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber (Cell scraper™)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsiebe (40; 100 µm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen (2; 15; 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

Sets

miRNeasy MiniKit	Quiagen (Hilden)
NucleoSpin RNA purification	Machery-Nagel (Düren)
NucleoSpin DNA RapidLyse	Machery-Nagel (Düren)
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Quiagen (Hilden)

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
6-FAM-dArUdAdA-TAMRA	Integrated DNA Technologies (Coralville, USA)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Universal-Agarose	Bio & Sell (Feucht)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Promocell (Heidelberg)
cDNA-Synthese-Kit (PrimeScript™)	Takara Bio Europe (St.-Germain-en-Laye, Frankreich)
Chloroform (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Crystal RNAmagic	Biolabproducts (Bebensee)
Demineralisiertes Wasser	eigene Herstellung TKA™
(vollentsalzt, VE-Wasser)	Smart2Pure™
Einfriermedium Cryo-SFM	Promocell (Heidelberg)
Ethanol (≥ 99,8 %)	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum	Gibco (Eggenstein)
L-Glutamin (200mM)	Gibco (Eggenstein)
MES ≥ 99,9 %	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco (Eggenstein)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco (Eggenstein)
RNA-later	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Select Agar	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SYBR-Green Premix Ex Taq™	Takara Bio Europe (St.-Germain-en-Laye, Frankreich)

Transfektionsreagenz HiPerFect	Quiagen (Hilden)
Trypsin/EDTA 0,05 %	Gibco (Eggenstein)
Medien:	
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) (Low Glucose w/o L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate)	Biowest (Nuaillé, Frankreich)
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) Supplement Mix	Promocell (Heidelberg)
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) Supplement Pack	Promocell (Heidelberg)
RPMI1640 (w/o L-Glutamine)	Gibco (Eggenstein)

3.1.4 Lösungen/ Puffer/ Medien

Zellkulturmedien

DMEM (++-)

- 500 ml DMEM
- 50 ml FCS
- 5 ml L-Glutamin

Vollmedium plus

KGM2 (+++)

- 500 ml KGM2 Basalmedium
- Supplement Mix
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S)

Vollmedium

KGM2 (++-)

- KGM2 (+++) ohne Zugabe von P/S

Minimalmedium

KGM2 (-+-)

- KGM2 (+++) ohne Zugabe von Supplement Mix und P/S

Puffer / Lösungen für den ELISA

Natriumcarbonatpuffer 0,05 M; pH = 9,6

- 15 mM Natriumcarbonat (1,59 g/l)
- 35 mM Natriumhydrogencarbonat (2,93 g/l)
- 1 l VE-Wasser
- pH-Wert mit Ameisensäure einstellen

Natriumphosphatpuffer (NaPP) 10 mM; pH = 7,2

Zusammensetzung:

3,16 ml Lösung 1

+ 6,84 ml Lösung 2

+ auf 1 l mit VE-Wasser auffüllen

Autoklavieren

Lösung 1:

- 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (177,9 g) in 1 l VE-Wasser lösen

Lösung 2:

- 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (137,9 g) in 1 l VE-Wasser lösen

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS); (10x) pH = 7,4

- 2 g KCL
- 2,4 g KH_2PO_4
- 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 80g g NaCl
- In 100 ml VE-Wasser einstellen

- Gebrauchslösung (x1) 1:10 in VE-Wasser verdünnen

Waschpuffer (WP) 0 PBS-T (0,05 %)

- 1 l PBS (1x)
- Zugabe von 500 µl TWEEN® 20

PBS/ 1% BSA

- 25 ml PBS (1x)
- Zugabe von 0,25 g BSA

3.1.5 Antikörper

Antikörper für Stimulationen

Antikörper	Hersteller/ Referenz
RNase 7, polyklonal, Ziege	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin) (Köten et al. 2009)
Irrelevanter Antikörper, Ziege, IgG, Normalserum	ZIKA-Kaninchenbetrieb (Gottin)

Antikörper für den ELISA

Kit	Hersteller/ Referenz
Human TSLP ELISA MAX™ Deluxe Set # 434204	BioLegend (Californien, USA)

3.1.6 Sonstige Agenzien

Agens	Hersteller/Referenz
RNase A	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)

Rekombinante RNase 7	im Labor der Hautklinik exprimiert (Köten et al. 2009)
Natürliche RNase 7	im Labor der Hautklinik isoliert
RNase 7 Mutante	im Labor der Hautklinik exprimiert (Knöten et al. 2009)
Human Genomic DNA	Merck KG, Novagen (Darmstadt)
Poly (I:C), High Molecular Weight	InvivoGen (San Diego, USA)
Rekombinantes (rek.) humanes Interleukin-4 (#200-04)	Peptrotech (Hamburg)
Rek. humanes Interleukin-13 (#200-13)	Peptrotech (Hamburg)
Rek. humanes Interleukin-17a (#200-17)	Peptrotech (Hamburg)

3.1.7 Oligonukleotide

siRNA

Hersteller	siRNA
Ambion, Thermo Scientific (Hamburg)	RNase 7 (s224956) Negativkontrolle No. 1
ON-TARGETplus, Dharmacon (Freiburg)	SMARTpool RHN1 Non-targeting

Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
-------------	-------------------------

Reverse Transkriptase

Oligo (dT) (T)₁₈

RT-PCR

RP38 f1	TCAAGGACTTCCTGCTCACA
RP38 r1	AAAGGTATCTGCTGCATCGAA
TNF- α f	TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC
TNF- α r	TCAGCTTGAGGGTTTGCTACAA
IL-6 f1	GGTACATCCTCGACGGCATCT
IL-6 rf	GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC
IL-8 f1	TCCTGATTTCTGCAGCTCTGT
IL-8 r1	TCCTGATTTCTGCAGCTCTGT
IL-17c f1	CCTGGAGATACCGTGTGGAC
IL-17c f2	CATCGATACAGCCTCTGCAC
R7 f1	CTGACAGCCTAGGAGTGCG
R7 r1	GAGGAGCAGTCAGGATGGAG
RI f1	GAGCGACGCTAGATGGGCCG
RI r1	GCAATGCACGCCGACATCGC
TSLP-I f1	GGGCTGGTGTTAACTTACGACTTCA
TSLP-I r1	ACTCGGTACTTTTGGTCCCCTCA
TSLP-s f1	CGTAACTTTGCCGCCTATGA
TSLP-s r1	TTCTTCATTGCCTGAGTAGCATTTAT

3.1.8 Humane Zellen

Zellen	Hersteller/Referenz
NHEK.f-p- pooled cells	Promocell (Heidelberg)

3.1.9 Software

Statistiksoftware	GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
Kalkulations-/Darstellungssoftware	Microsoft Exel 2010
	Microsoft PowerPoint 2010
	Microsoft Word 2010
	(Microsoft, Remond, USA)
Gerätesoftware	NanoDrop 1000 (Version 3.6.0)
	SteoOnePlus™ Software (Version 2.1)
	AxioVision Mikroskopsoftware

3.2 Methoden

3.2.1 Zell- und mikrobiologische Methoden

Sowohl die zell- als auch die mikrobiologischen Arbeiten wurden immer unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

3.2.1.1 Kultivierung humaner Keratinozyten

NHEK Zellen (Normale humane epidermale Keratinozyten; Promocell, Heidelberg) sind aus juvenilen Präputien isolierte primäre Keratinozyten. Hierbei handelt es sich um einen Zellpool, bei welchem die Keratinozyten von drei bis fünf Spendern vereint worden sind. Die Zellen wurden auf Flaschen der Firma Corning in KGM2 (+++) Medium hochgezogen. Für Versuche mit NHEK Zellen wurden 24-Loch-Flachbodenplatten der Firma Corning verwendet.

Die Inkubation aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂. Alle zwei Tage wurden die Zellen mit frischem KGM2 (++-) Medium gefüttert. Das Aussehen und das Wachstum der Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt.

Bei einer Konfluenz von 80 % bis 90 % wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin/EDTA (T/E) abgedaut. Dazu wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 5 ml T/E versetzt. Nach sechs Minuten im Brutschrank wurde das Ablösen der Zellen durch leichtes Klopfen auf die Flasche verstärkt und unter dem Mikroskop kontrolliert. Das T/E-Zellgemisch wurde anschließend in FCS-haltigem DMEM (++-) Medium aufgenommen, um das Trypsin zu neutralisieren. Die Suspension wurde in 50 ml Tubes überführt und bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen anschließend in KGM2 (+++ oder ++-) resuspendiert und in neue Flaschen gegeben oder der Versuchsanordnung entsprechend in Platten für Stimulationen ausgesät.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um die längere Aufbewahrung von Zellen zu ermöglichen, wurde die Technik der Kryokonservierung angewendet. Hierbei wurden die Zellen in der vierten Passage nach der Zentrifugation mit 1000 µl Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde anschließend in ein Kryokonservierungsgefäß gegeben und über Nacht bei -80 °C gelagert.

Der Einfrierungsprozess beträgt bei dieser Methode etwa 1 °C bis 3 °C pro Minute. Am zweiten Tag wurden die Zellen bis zum Gebrauch in den Stickstofftank überführt und gelagert.

3.2.1.3 Stimulation von Keratinozyten

Die Zellen wurden zur Stimulation in 24-Loch-Flachbodenplatten ausgesät. Bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen ohne Einsatz von Antibiotika mit KGM2 (++-) Medium kultiviert. Zur Stimulation wurde immer Minimalmedium KGM2 (-+-) verwendet und somit auf Zusätze wie zum Beispiel Antibiotika verzichtet.

Die verwendeten Stimuli sind im Abschnitt Material dargelegt worden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Stimuli in den gewünschten Konzentrationen für 24 h zugesetzt. Die Stimulation erfolgte immer im Brutschrank bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂. Bei Beendigung der Stimulation wurden die Überstände stets abgenommen und für eventuelle ELISAs bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurden die Platten mit PBS gewaschen und die Zellen in Crystal RNAmagic zur RNA-Isolierung aufgenommen.

3.2.1.4 Transiente Transfektion mit Keratinozyten

Bei einigen Versuchen wurde vor der Stimulation eine Transfektion mit der Methode der RNA-Interferenz durchgeführt. Hierbei wurden kurze RNA-Moleküle eingesetzt, um das mRNA Zielgen herunter zu regulieren. Dadurch soll die Relevanz des betroffenen Gens für den Versuch untersucht werden.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 % bis 90 % transfiziert. Der Transfektionsansatz bestand aus 98,85 µl Minimalmedium, 1,5 µl HiPerfect und 0,25 µl siRNA. Der Ansatz wurde nach dem Zusammenpipettieren kurz gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Platte mit PBS gewaschen. Nach erfolgter Inkubation des Transfektionsansatzes wurden zu 250 µl KGM (++-) jeweils 100 µl Ansatz pro Well hinzu getropft. Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Transfektionsansatz erfolgte ein Mediumwechsel mit KGM2 (++-). Nach erneuten 24 h wurden die Simulationen durchgeführt.

3.2.2 Proteinnachweisverfahren

3.2.2.1 Sandwich-ELISA

Zum Nachweis von Proteinen in den Zellkulturüberständen, welche nach den Stimulationsversuchen gewonnen worden sind, wurde das Verfahren des Sandwich-ELISAs angewendet, welches 1971 von Engvall und Perlmann zum Nachweis von Proteinen, Viren, Hormonen und Toxinen entwickelt worden ist (Engvall & Perlmann, 1971). ELISA ist die Abkürzung für *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung von Antigenen.

Die zu testenden Proben wurden auf einer Mikrotittierplatte inkubiert. Die Platte ist zuvor mit einem Antikörper gecoated sowie mehrfach gewaschen worden. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch Blocken mit Milchpulver oder anderen vergleichbaren Proteingemischen verhindert.

Das zu testende Protein bindet hierbei bereits den zuvor hinzugegebenen Antikörper. Im Anschluss wurde ein Detektionsantikörper auf die Platte gegeben, welcher an ein Enzym gekoppelt ist. Die abschließende Zugabe eines Substrats bewirkt das Umsetzen des Substrats durch das an den Detektionsantikörper gebundene Enzym. Bei dieser Reaktion entsteht ein Signal, welches per Farbreaktion detektiert werden kann. Die Intensität der Farbreaktion stellt sich hierbei proportional zur Proteinmenge dar.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 RNA Isolation

Zur Isolation der RNA wurde das Reagenz Crystal RNAmagic verwendet und nach der Single step Methode von Chomczynski und Sacchi vorgegangen (Chomczynski und Sacchi, 2006).

Nach Beendigung der Stimulation wurden die Überstände für eventuelle ELISAs abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

Nachdem die Platten mit PBS gewaschen worden sind, wurden die Zellen mit dem Reagenz Crystal RNAmagic versetzt und für mindestens 5 bis 10 Minuten lysiert. Das Phenol in dem Reagenz löst hierbei die RNA aus dem Lysat. Die Ansätze der verschiedenen Wells wurden in Schraubtubes überführt und mit Chloroform zentrifugiert. Dieser Vorgang bewirkt eine Phasentrennung, wobei sich die RNA oben als klare Flüssigkeit darstellt. Die mittlere, klare Phase entspricht den Proteinen und die untere, rote Phase wird von der DNA gebildet.

Nach erfolgter Phasentrennung wurde zur Fällung der RNA zur klaren RNA Phase Isopropanol hinzugefügt. Nach dem zweimaligen Waschen mit Ethanol liegt die RNA als Pellet vor.

Die RNA wurde im Anschluss mit 12 µl Wasser resuspendiert und sowohl die Konzentration als auch die Reinheit mit dem NanoDrop bei 260 nm Absorption gemessen.

3.2.3.2 Erststrang-cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA aus der in der Gesamt-RNA enthaltenen mRNA wurde die Reverse Transkriptase verwendet, welche zur RNA komplementäre DNA (cDNA) Stränge baut. Die Reaktion erfolgte mittels PrimeScript™ RT Reagent Kit nach Angaben des Herstellers.

Hierbei werden zu 1 µg RNA hinzugefügt

- Reaktionspuffer: dNTP (10 mM und RNase Inhibitor (40 U/µl)
- Oligo (dT) Primer (20 mM)
- PrimeScript RT
- RNase freies Wasser

Die Phasen der Erststrang cDNA-Synthese verlaufen wie folgt:

- Inkubationsschritt 65 °C, 5 min
- Syntheseschritt 42 °C, 30 min
- Inkubation 85 °C, 5 min
- Runterkühlen auf 4 °C

Im Anschluss wurde die cDNA mit 40 µl H₂O aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

3.2.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert bei der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR bzw. qPCR) in die PCR Produkte. Diese Tatsache ermöglicht die Detektion und Quantifizierung der Amplifikate in Echtzeit sowie den anschließenden Vergleich der Expressionsraten verschiedener Gene.

Für die Durchführung einer qPCR wurde ein Reaktionsansatz hergestellt, welcher aus 5,2 µl Premix (SYBR® Premix Taq™ II), 3 µl RNase freiem H₂O und jeweils 0,4 µl der genspezifischen Primer (10 µM, *forward and reverse*) besteht. Je nach Anzahl der zu messenden Proben wurde in eine 96-Loch-PCR-Platte oder einen 8er PCR Streifen 1 µl (10 ng) der zu testenden cDNA vorgelegt. Lediglich bei der Messung von der Genexpression von TSLP-I wurden 3 µl der zu testenden cDNA vorgelegt. Zu jeder cDNA wurden 9 µl des Reaktionsansatzes gegeben. Die Platte bzw. der Streifen wurde luftdicht verschlossen, für 1 min bei 200 g zentrifugiert und für die Genamplifikation im „StepOne Plus Real-Time PCR System“ überführt.

Bei allen Primern erfolgte die Genamplifikation wie folgt:

1. 30 s 95 °C Anfangsdenaturierung
2. 30 s 66 °C Elongation
3. Abfall der Elongationstemperatur um 1 °C pro Zyklus (5 s 95 °C + 30 s Elongation)
4. 40 Zyklen mit 5 s 95 °C Denaturierung und 30 s 60 °C Elongation

Im Anschluss an diese Zyklen wurde immer eine Schmelzkurve der verschiedenen Primer erstellt, um unspezifische PCR Produkte ausschließen zu können.

3.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht das Auftrennen von RNA- und DNA-Fragmenten ihrer Länge nach. Die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 hat durch das Aufspalten der RNA maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse der Gelelektrophorese. Es wurde nach der 1987 beschriebenen Methode von Schägger und von Jagow vorgegangen (Schägger und von Jagow, 1987).

Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 100 ml TRIS Acetat EDTA (TAE) Puffer (40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8) durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 60 °C wurde 15 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Es erfolgte das Gießen der Lösung in die dafür vorgesehenen Kammern sowie das Einlegen der Kämme in die Kammern. Nach dem Erhärten des Gels wurden die zuvor vorbereiteten Proben in die Kammern aufgetragen.

Die zu testenden Proben wurden in den gewünschten RNA-Konzentrationen mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Zu einigen Proben wurden 2 µg rekombinante RNase 7 und DNA in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurde zum Abstoppen der Reaktion 5 µl Formamid hinzugegeben. Zu jedem Ansatz wurden 5 µl 6-fach Ladepuffer hinzugefügt und die Proben in die Kammern aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über 60 min konstant bei 100 V.

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die RNA- bzw. DNA-Banden mit dem interkalierenden Ethidiumbromid bei 266 nm detektiert und mit Hilfe einer Bio-Doc Fotodokumentationsanlage digital dokumentiert.

3.2.3.5 RNase Assay mit fluoreszierendem Substrat

Um die Einflüsse der DNA auf die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 in einem weiteren Versuch begutachten zu können, wurde ein RNase Assay mit dem fluoreszierenden Substrat 6-FAM~dArUdAdA~6-TAMRA durchgeführt. Bei diesem Assay wird das Substrat durch die RNase 7 gespalten. Dies führt dazu, dass das zuvor gequenchte 5-Fluorescein fluoresziert. Diese Fluoreszenz lässt sich messen, wodurch sich die Aktivität der RNase 7 bestimmen lässt.

Der Assay wurde zunächst als Positivkontrolle mit RNA und RNase 7 durchgeführt. Für den Assay wurde im Voraus ein MES-Puffer hergestellt. Hierzu wurde MES in frischem H₂O gelöst. Mit NaOH wurde ein pH-Wert von 6 eingestellt. Anschließend wurde 0,58 g NaCl hinzugegeben und der Puffer mit einem 0,2 µm Filter in eine neue Flasche steril filtriert. Bis zur Nutzung wurde der Puffer im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die unterschiedlichen Ansätze, bestehend aus MES Puffer, RNase 7 und unterschiedlich hohen DNA-Konzentrationen, wurden in 0,5 ml Gefäßen angesetzt, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde eine 1:4 Verdünnung des 10 µM Substrates hergestellt. Von dieser Vorverdünnung wurde 1 µl auf 75 µl MES verdünnt (0,033 µM).

Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze komplett in eine schwarze MTP 96-Well-Platte von NUNC pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurden je 75 µl des Ansatzes aus Substrat und H₂O in die Wells hinzu pipettiert.

Bei einer Extinktionswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm erfolgte eine fünfminütige Zeitkinetik mit dem Mikroplattenreader Tecan i-control.

3.2.4 Graphische Darstellung und Analyse der Ergebnisse

Die Analysen der im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Daten erfolgten über Microsoft Excel® bzw. über die Statistiksoftware Graph Pad Prism (GraphPad Prism Software, Version 8.4.3, San Diego, USA). Die Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken gekennzeichnet.

Um Veränderungen einer bestimmten Variablen bei zum Beispiel Konzentrations- oder Zeitkinetiken statistisch zu untersuchen wurde zunächst eine Analyse auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Waren die Daten normalverteilt, wurden sie mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Die Signifikanzniveaus der multiplen Testungen wurden dabei durch die Holm-Sidak-Korrektur angepasst. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurden sie nichtparametrisch mittels Kruskal-Wallis-Analyse untersucht. Dabei wurden die Signifikanzniveaus der multiplen Testungen mit der Dunn-Korrektur angepasst.

Wurden nur zwei Populationen untersucht, wie zum Beispiel eine Stimulation mit oder ohne siRNA-transfizierten Zellen, wurde auch hier zunächst eine Analyse auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Waren die Daten normalverteilt, wurden sie parametrisch mittels Student's *t*-Test statistisch analysiert. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde die nichtparametrische Mann-Whitney-Testung zur statistischen Analyse herangezogen.

Die verwendeten Signifikanzlevel entsprechen bei einem Stern $p < 0,05$, bei zwei Sternen $p < 0,01$ sowie bei drei Sternen $p < 0,001$. Über den jeweiligen Balken in den Diagrammen wurde Signifikanz durch entsprechende Anzahl an Sternen dargestellt, nicht signifikante Ergebnisse wurden ebenfalls entsprechend gekennzeichnet (n.s.). Wenn nicht anders angegeben bezieht sich das Signifikanzniveau über den Balken auf die entsprechende Kontrolle.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss der Ribonukleaseaktivität der RNase 7 auf kutane Entzündungsreaktionen der Haut zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Gene gemessen, von denen nur einige in dieser Doktorarbeit dargestellt worden sind. Auf Grund des Schwerpunkts der Arbeit auf entzündliche Prozesse der Haut werden neben dem bereits erwähnten TSLP-I hier die Ergebnisse der Messungen von IL-6, IL-8, IL-17c sowie TNF- α dargestellt.

Alle hier dargestellten Versuchsdaten entstammen wiederholten Stimulationen (mindestens $n=3$). Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt und haben sich als reproduzierbar erwiesen.

Im Vorfeld wurde zu jedem Primerpaar eine Standardkurve angefertigt, welche stets in die Auswertung miteinbezogen worden ist. Als Standard wurde das ribosomale Protein L38 (RP38) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein in Epithelzellen konstant exprimiertes, nicht reguliertes *Housekeeping Gene*. In der über Microsoft Excel® erfolgten Auswertung wurde der Quotient aus RP38-Transkriptionslevel und gemessenem Gen und damit die relative mRNA Expression bestimmt.

4.1 Versuche zur Konzentrationskinetik

Zu Beginn der Untersuchungen wurde mit Hilfe von Konzentrationskinetiken bestimmt, mit welcher Konzentration Poly(I:C) die Keratinozyten im Verlauf stimuliert werden sollen. Die Stimulationen wurden nach 16 h beendet. Es wurden die Expressionen verschiedener Gene zu Rate gezogen und jeweils darauf geachtet, bei welcher Konzentration noch eine signifikante Induktion der Genexpression erreicht wird.

4.1.1 TSLP-I und TSLP-s

Es konnte festgestellt werden, dass Poly(I:C) in den Konzentrationen 500 ng/ml sowie 100 ng/ml die TSLP-I-Genexpression signifikant induziert (Abb. 7A).

Bei Konzentrationen unter 100 ng/ml konnte keine signifikante Genexpression mehr erreicht werden. Bei der Messung der TSLP-s-Genexpression konnte keine Induktion durch Stimulationen mit Poly(I:C) gezeigt werden (Abb. 7B). Auch die Messung der Proteinkonzentration von TSLP ergaben eine signifikante Induktion bei Stimulation mit 500 ng/ml Poly(I:C) (Abb. 7C).

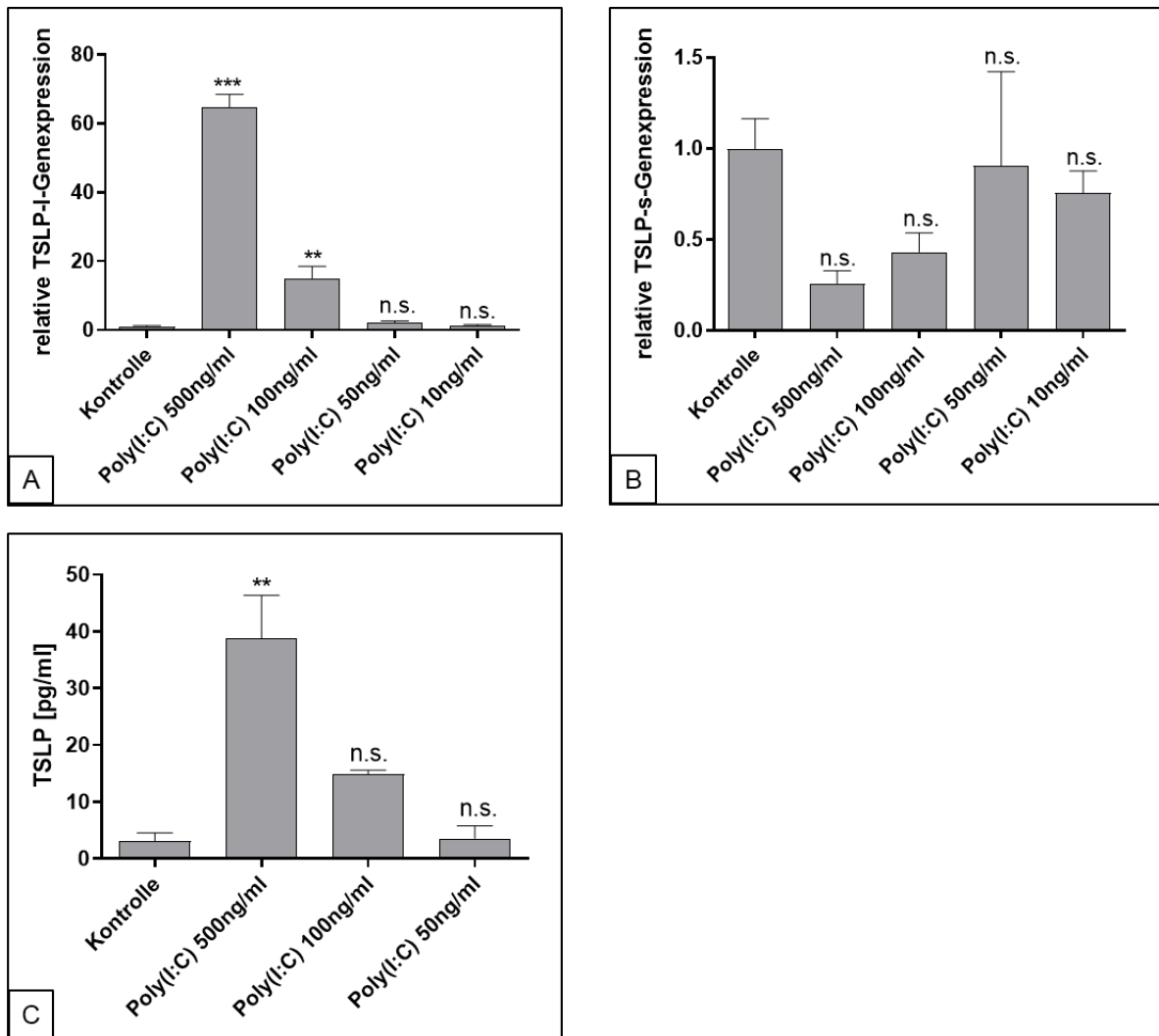


Abbildung 7: Stimulationen mit Poly(I:C) bewirken konzentrationsabhängig Induktionen der TSLP-I Genexpression (A), jedoch nicht der TSLP-s-Genexpression (B). Die Induktion von TSLP ist auch auf Proteinebene nachweisbar (C).

Postkonfluente NHEK wurden über 16 h mit 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml und 10 ng/ml Poly(I:C) stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative TSLP-I- (A) und TSLP-s- (B) Genexpression bestimmt sowie die TSLP-I-Konzentration mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; **p < 0,01, ***p < 0,001; einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur).

4.1.2 TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17c

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit Poly(I:C) in den Konzentrationen 500 ng/ml sowie 100 ng/ml die Genexpressionen von TNF- α (Abb. 8A), IL-6 (Abb. 8B), IL-8 (Abb. 8C) sowie IL-17c (Abb. 8D, hier nur bei 500 ng/ml) signifikant induzieren. Bei Konzentrationen unter 100 ng/ml konnte keine signifikante Induktion der Genexpression mehr erreicht werden (Abb. 8A-D).

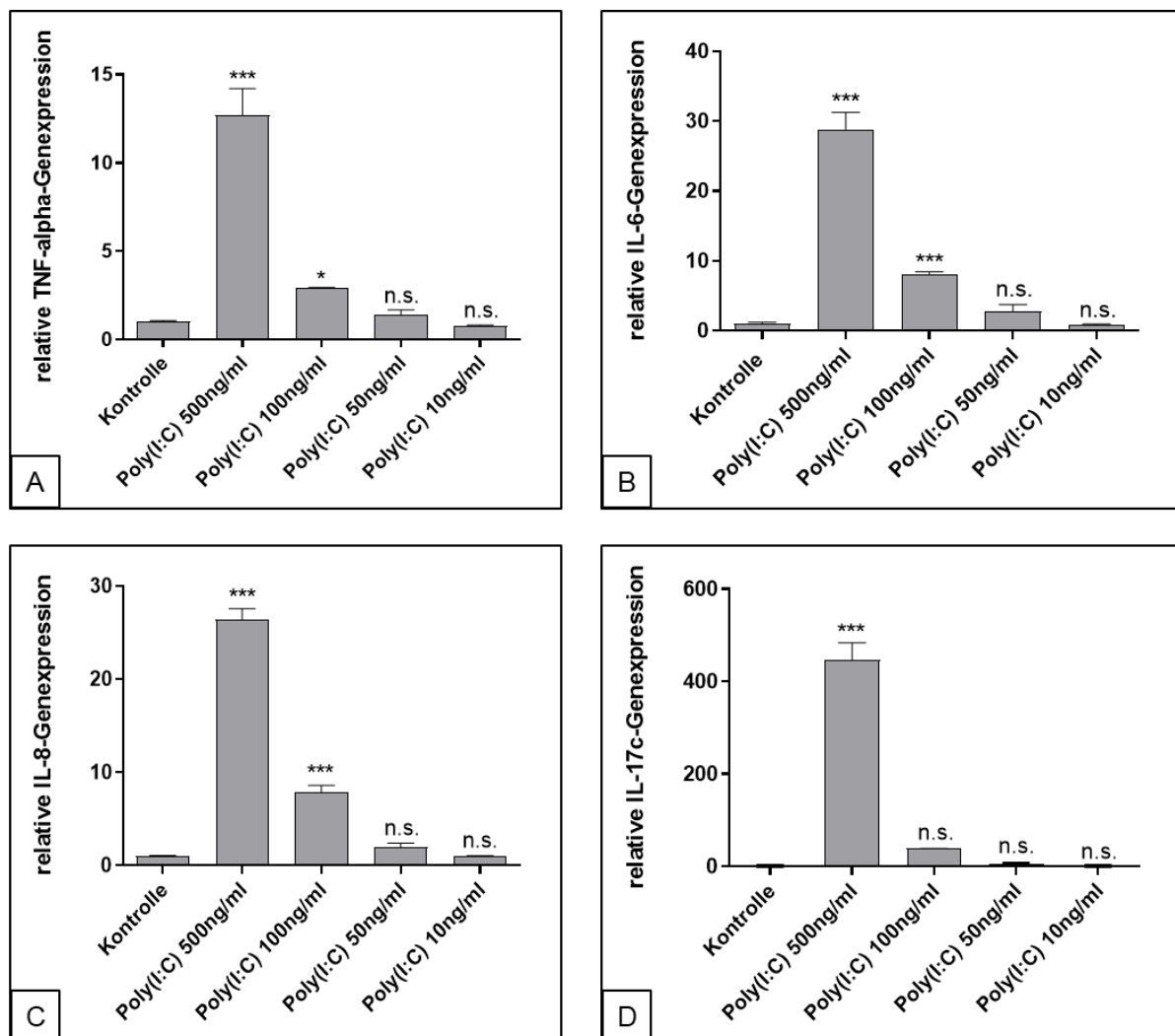


Abbildung 8: Höhere Poly(I:C) Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der Genexpressionen von TNF- α (A), IL 6 (B), IL-8 (C) und IL-17c (D)

Postkonfluente NHEK wurden über 16h mit 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml und 10 ng/ml Poly(I:C) stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die Genexpression von TNF- α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) und IL-17c (D) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur).

4.2 Versuche zur Zeitkinetik mit und ohne IL-4 und IL-13

Im Anschluss an die zu Beginn der Untersuchung durchgeführten Konzentrationskinetiken bezüglich Poly(I:C) wurden im nächsten Schritt Zeitkinetiken durchgeführt, um eine effiziente Dauer der Stimulation bestimmen zu können (Abb. 9). Es erfolgte zusätzlich zur alleinigen Stimulation mit Poly(I:C) die Stimulation mit jeweils 50 ng/ml der Zytokine IL-4 und IL-13, sowohl mit als auch ohne Poly(I:C). Die Stimulationen wurden nach 4 h (Abb. 9A), 8 h (Abb. 9B), 16 h (Abb. 9C) und 24 h (Abb. 9D) beendet. Im Anschluss wurde der gleiche Versuch erneut durchgeführt und nach 24 h sowie nach 48 h beendet (Abb. 11). Zuvor hatten sich Konzentrationen von 500 ng/ml sowie 100 ng/ml Poly(I:C) als ausreichend erwiesen, um eine gute Induktion der Genexpression verschiedener Gene zu erzielen. Durch die Stimulation mit 500 ng/ml Poly(I:C) konnte jedoch eine stärkere Induktion erzielt werden. 500 ng/ml entsprächen hier sehr hohen Poly(I:C) -Konzentrationen, bei welchen die Möglichkeit bestünde, dass die Ribonukleaseaktivität der intrinsischen RNase 7 Aktivität nicht ausreicht, um die hohen Mengen an Poly(I:C) adäquat zu degradieren. Aus diesem Grund wurde ab dem jetzigen Zeitpunkt eine Poly(I:C) Konzentration von 200 ng/ml verwendet.

Auch bei den Versuchen zur Zeitkinetik wurde auf die Induzierbarkeit der Genexpression von verschiedenen Genen geachtet. Die Messungen zu der kurzen Form von TSLP-s zeigten im gesamten weiteren Verlauf keine Induzierbarkeit, weshalb sie nicht weiter aufgeführt worden sind.

4.2.1 TSLP-I

Es wurden Stimulationen mit 200 ng/ml Poly(I:C) und den Zytokinen IL-4 und IL-13 durchgeführt (Abb. 9). Diese Stimulationen wurden nach 4 h (Abb. 9A), 8 h (Abb. 9B), 16 h (Abb. 9C) und 24 h (Abb. 9D) beendet. Hierbei zeigten sich nach 4 h, 8 h und 24 h jeweils stärkere Induktionen der Genexpression von TSLP-I bei einer kombinierten Stimulation mit Poly(I:C) und den Zytokinen.

Nach 16 h zeigte sich eine stärkere Induktion bei alleiniger Stimulation mit Poly(I:C) (Abb. 9C). Die alleinige Stimulation mit den Zytokinen zeigte keinen signifikanten Anstieg der Genexpression von TSLP-I.

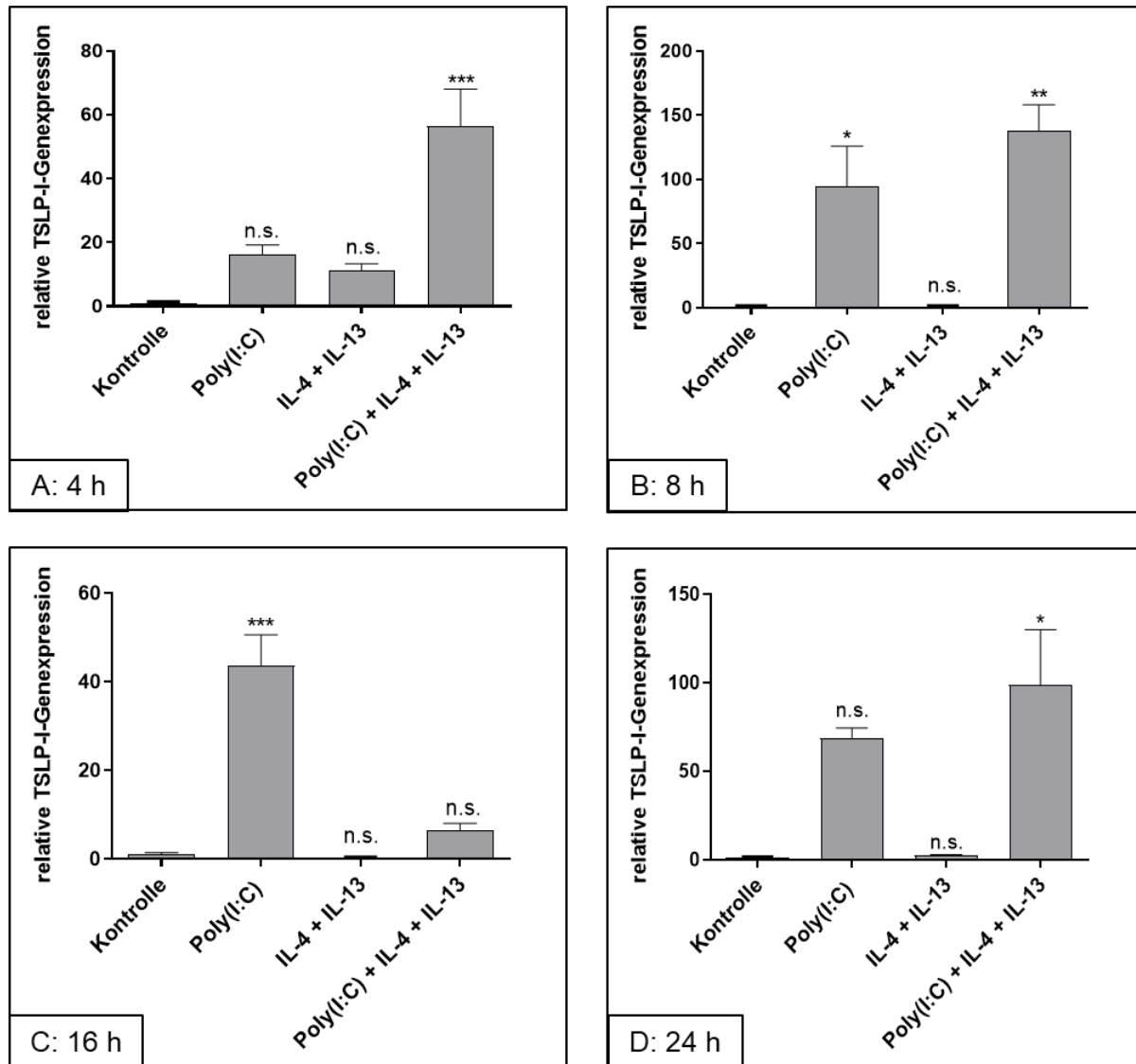


Abbildung 9: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) sowie 24 h (D) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TSLP-I

Postkonfluente NHEK wurden über 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) und 24 h (D) mit 200 ng/ml Poly(I:C) mit und ohne jeweils 50 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative TSLP-I Genexpression sowie die TSLP-Konzentration mittels ELISA bestimmt (siehe hierzu Abbildung 10, (A) (4 h), (B) (8 h), (C) (16 h) und (D) (24 h)). Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; A-C: einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur, D: Kruskal-Wallis-Analyse mit Dunn-Korrektur).

Zusätzlich zu den Messungen der Induktionen der Genexpressionen bei Stimulation mit Poly(I:C) mit und ohne IL-4 und IL-13 nach 4h, 8h, 16h und 24h wurden die Induktionen der TSLP-Konzentrationen nach 4h (Abb. 10A), 8h (Abb. 10B), 16h (Abb. 10C) und 24h (Abb. 10D) gemessen. Bei einer Stimulationsdauer von 4h, 8h und 16h konnte weder bei der alleinigen Stimulation mit Poly(I:C) noch bei der kombinierten Stimulation mit Poly(I:C) und IL-4 und IL-13 eine signifikante Induktion der TSLP-Konzentration erzielt werden (Abb. 10 A-C). Lediglich bei einer Stimulationsdauer von 24h zeigte sich bei alleiniger Stimulation mit Poly(I:C) und in Kombination mit IL-4 und IL-13 eine signifikante Induktion von TSLP (Abb. 10D).

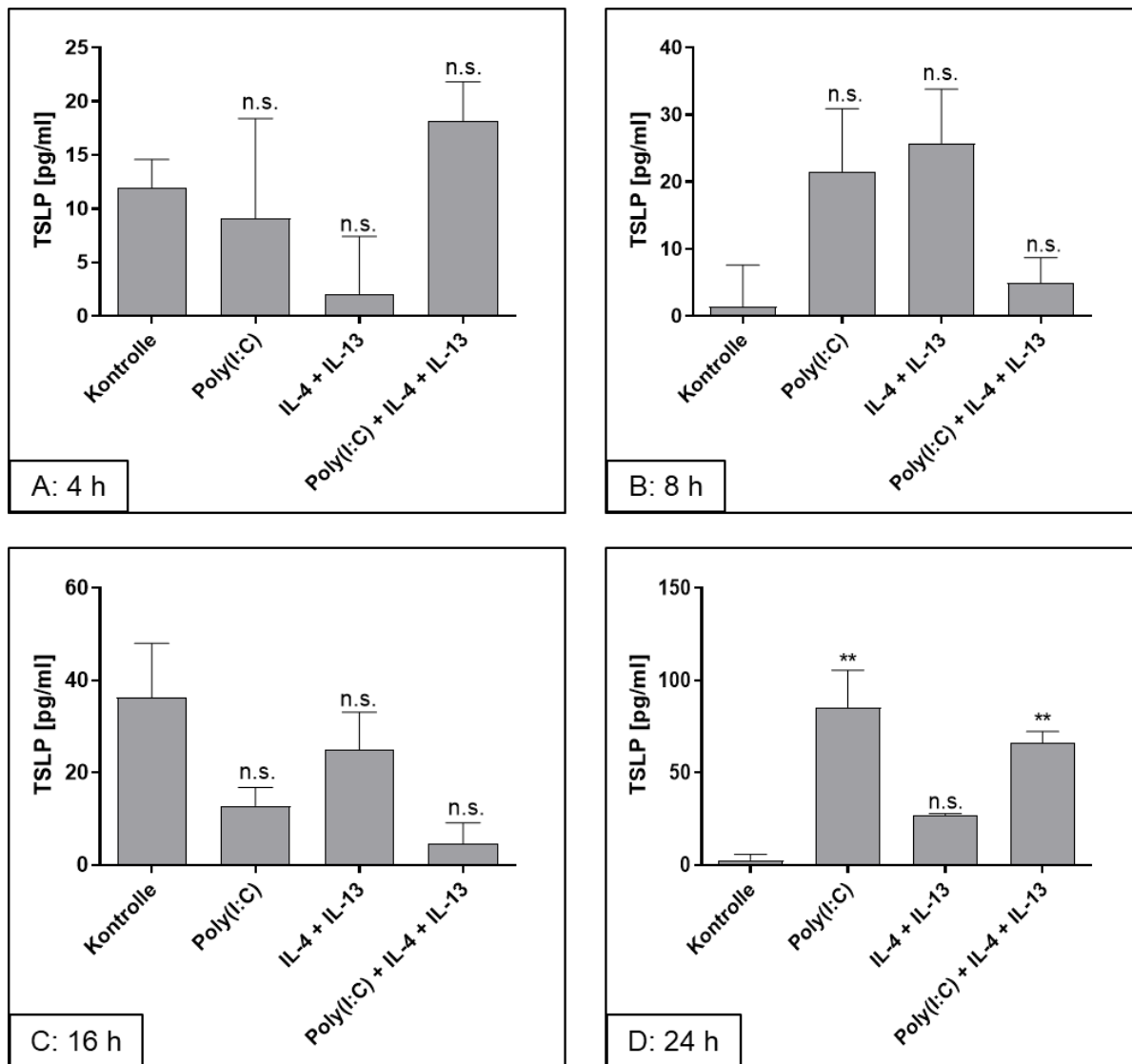


Abbildung 10: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) sowie 24 h (D) unterschiedlich hohe Induktionen der TSLP-Konzentration.

Postkonfluente NHEK wurden über 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) und 24 h (D) mit 200 ng/ml Poly(I:C) mit und ohne jeweils 50 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels ELISA die TSLP-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant, **p < 0,001; einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur).

In einem weiteren Versuch wurden NHEK erneut mit 200 ng/ml Poly(I:C) mit und ohne jeweils 50 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Die Stimulationen wurden nach 24 h und 48 h beendet (Abb. 11). Bei der Beendigung der Stimulation nach 24 h zeigte sich sowohl bei dem Einsatz von Poly(I:C) mit als auch ohne die Zytokine erneut eine signifikante Induktion der Genexpression von TSLP-I, auch wenn diese weniger stark ausfiel als bei der vorherigen Zeitkinetik (Abb. 11A). Bei einer Beendigung der Stimulation nach 48 h ließ sich durch die Stimulation mit und ohne Zytokine sowie Poly(I:C) keine signifikante Induktion zeigen. Hier führte die Stimulation mit Poly(I:C) und in Kombination mit Zytokinen zu einer signifikanten Herunterregulation der TSLP-I Genexpression (Abb. 11B).

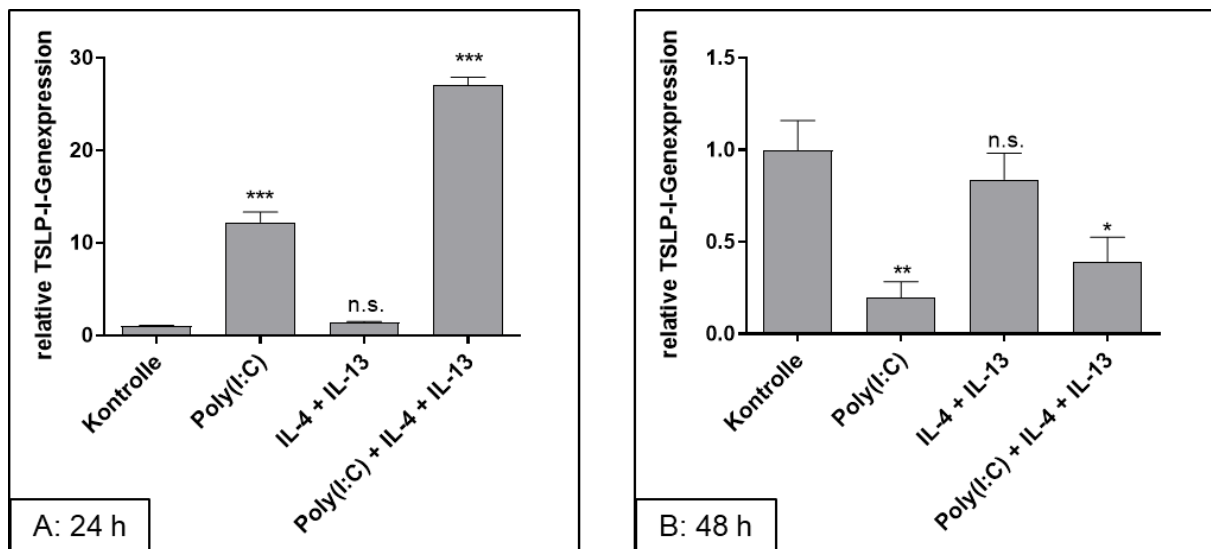


Abbildung 11: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 24 h (A) und 48 h (B) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TSLP-I

Postkonfluente NHEK wurden über 24 h (A) und 48 h (B) mit 200 ng/ml Poly(I:C) mit und ohne jeweils 50 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative TSLP-I-Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur).

4.2.2 TNF- α

Es wurden Stimulationen von NHEK mit 200 ng/ml Poly(I:C) und jeweils 50 ng/ml der Zytokine IL-4 und IL-13 durchgeführt. Diese Stimulationen wurden nach 4 h, 8 h, 16 h und 24 h beendet (Abb. 12).

Hierbei zeigte sich nach 4 h (Abb. 12A), 8 h (Abb. 12B) und 24 h (Abb. 12D) jeweils eine Induktion der Genexpression von TNF- α nach Stimulation mit Poly(I:C), die in Anwesenheit von IL-4 und IL-13 nicht verstärkt wurde. Nach 16 h zeigte sich keine signifikante Induktion (Abb. 12C).

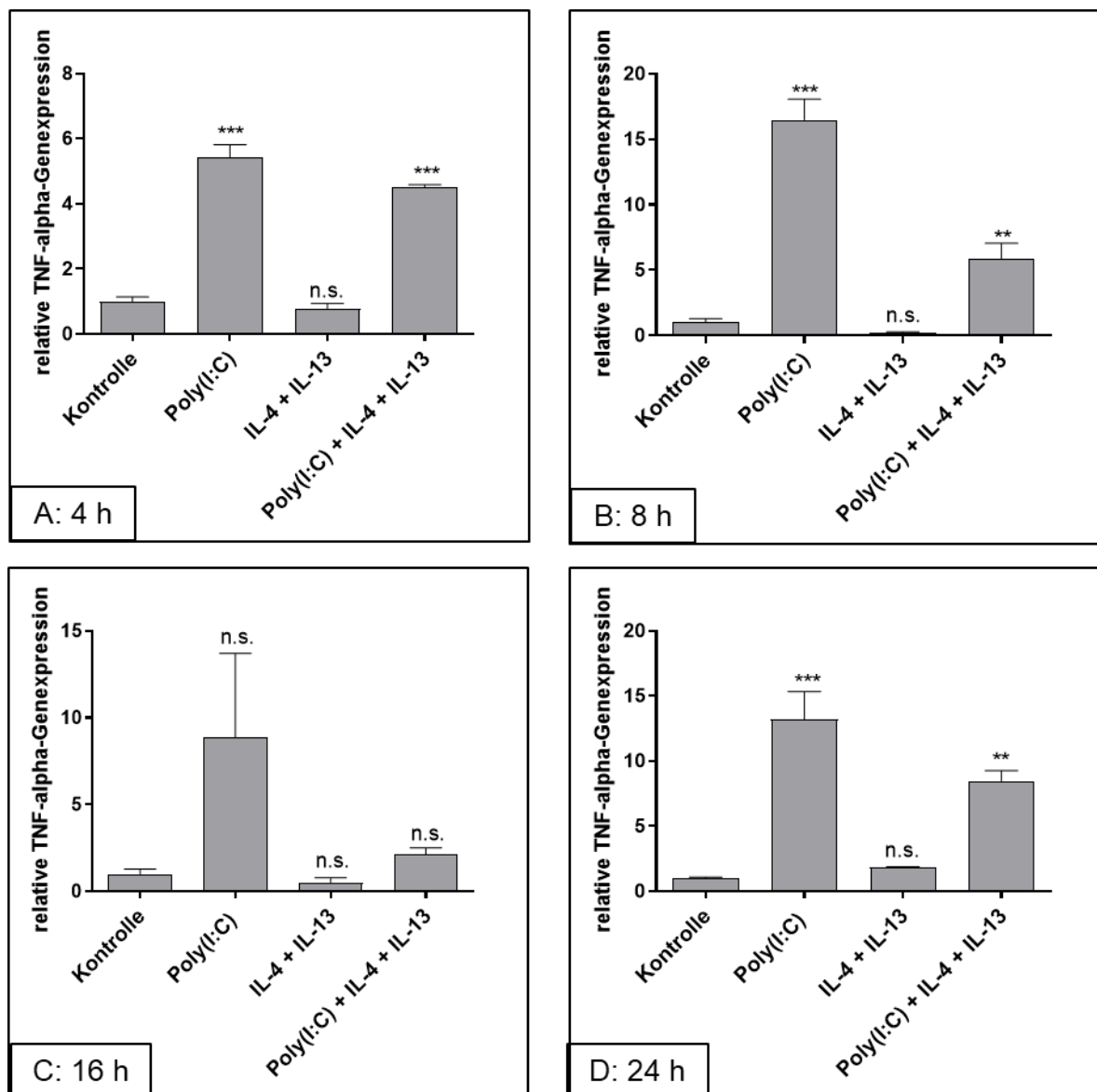


Abbildung 12: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) sowie 24 h (D) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TNF- α

Postkonfluente NHEK wurden über 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) und 24 h (D) mit 200 ng/ml Poly(I:C) mit und ohne jeweils 50 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative TNF- α -Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant, **p < 0,01; ***p < 0,001; einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur)

Bei dem weiteren Versuch zur Zeitkinetik mit Beendigung nach 24 h und 48 h zeigte sich ähnlich zu den Messungen der Genexpression von TSLP-I nach 24 h sowohl bei Stimulation mit Poly(I:C) in Kombination mit den Zytokinen als auch bei Stimulation mit Poly(I:C) ohne Zytokine eine signifikante Induktion der Genexpression von TNF- α (Abb. 13A). Nach 48 h zeigte sich bei der alleinigen Stimulation mit den Zytokinen eine signifikante Induktion. Im Gegensatz dazu ergab sich bei der kombinierten Stimulation von Poly(I:C) mit den Zytokinen keine signifikante Induktion der TNF- α -Genexpression mehr (Abb. 13B).

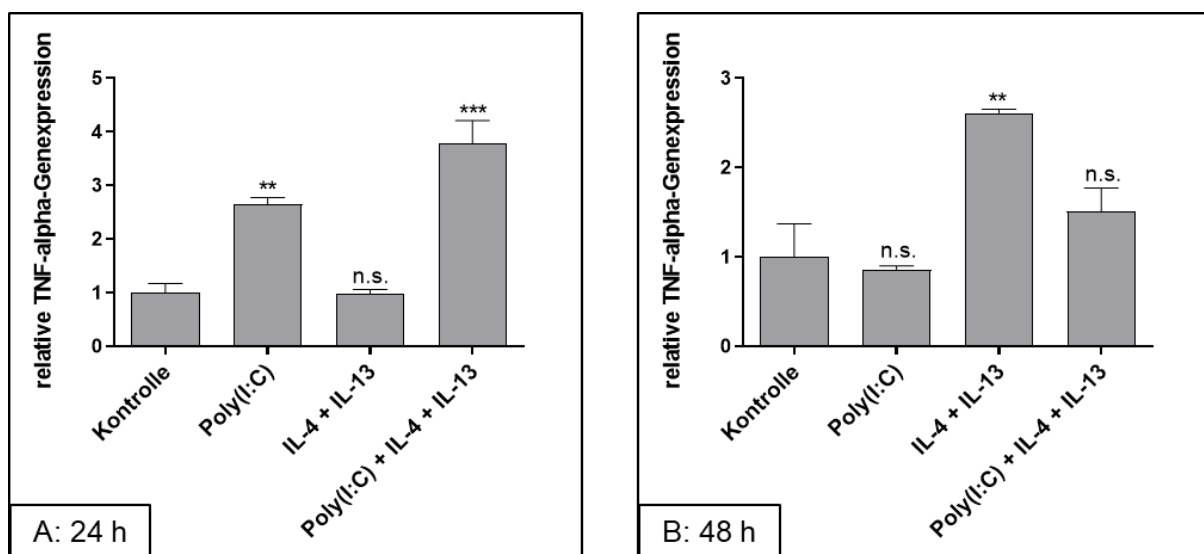


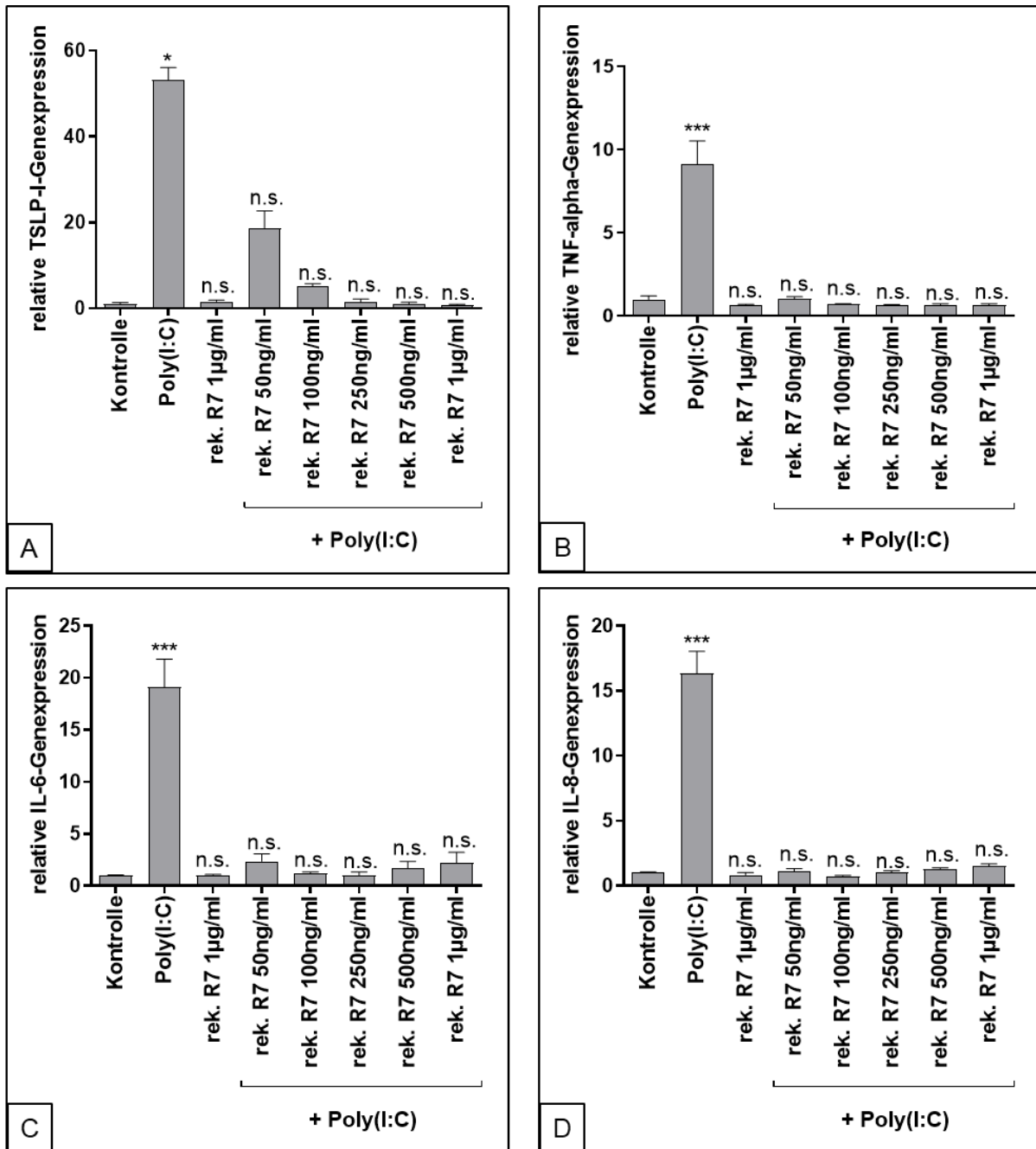
Abbildung 13: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 24 h (A) und 48 h (B) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TNF- α

Postkonfluente NHEK wurden über 24 h (A), 48 h (B) mit 200 ng/ml mit und ohne jeweils 50 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative TNF- α -Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (n.s. = nicht signifikant; **p < 0,05, ***p < 0,001; einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur)

4.3 Stimulationen mit rekombinanter RNase 7

Nach den Bestimmungen der Konzentrationen von Poly(I:C) sowie der Zeitspanne, in welcher die folgenden Stimulationen durchgeführt werden sollten, erfolgte die Stimulation mit rekombinanter RNase 7. Wie in der Fragestellung beschrieben, war das primäre Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der RNase 7 auf kutane Entzündungsprozesse zu untersuchen. Es war die Hypothese aufgestellt worden, dass freiwerdende RNA die Entzündungsantwort induziert. Diese Hypothese wurde mit der alleinigen Stimulation von NHEK mit Poly(I:C) untersucht. Weiter ist angenommen worden, dass die RNase 7 durch ihre Aktivität als Ribonuklease freie RNA degradiert (Abb. 3). Führt man diese Vermutungen zusammen, so müsste die kombinierte Stimulation mit Poly(I:C) und rekombinanter RNase 7 in einer verminderten Entzündungsantwort resultieren.

Um dies zu untersuchen, wurden Stimulationen mit Poly(I:C) und unterschiedlichen Konzentrationen rekombinanter RNase 7 durchgeführt (Abb. 14). Es wurde deutlich, dass bereits geringe Konzentrationen rekombinanter RNase 7 großen Einfluss auf die Induktion der Genexpression proinflammatorischer Zytokine besitzt. Poly(I:C) wurde für eine Stunde mit unterschiedlich hohen Konzentrationen rekombinanter RNase 7 vorinkubiert. Im Anschluss an die einstündige Vorkinkubation erfolgte die vierundzwanzigstündige Stimulation der NHEK. Bereits eine Konzentration von 50 ng/ml rekombinante RNase 7 führte zu einem signifikanten Abfall der Induktion der Expression von TSLP-I (Abb. 14A), TNF- α (Abb. 14B), IL-6 (Abb. 14C), IL-8 (Abb. 14D) und IL-17c (Abb. 14E).



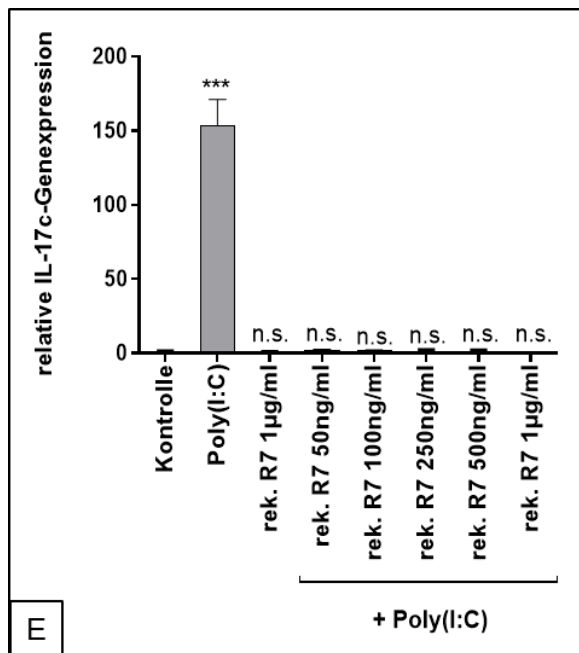


Abbildung 14: Die einstündige Vorinkubation von Poly(I:C) mit rekombinanter RNase 7 hat konzentrationsabhängig Einfluss auf die Induktion der Genexpression von TSLP-I (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-8 (D) und IL-17c (E).

Postkonfluente NHEK wurden mit 200 ng/ml Poly(I:C) stimuliert. Das Poly(I:C) wurde zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen rekombinanter RNase 7 für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte die vierundzwanzigstündige Stimulation der NHEK. Bei alleiniger Stimulation mit Poly(I:C) zeigten sich deutliche Induktionen der Genexpressionen von TSLP-I (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-8 (D) und IL-17c (E). Die alleinige Stimulation mit rekombinanter RNase 7 zeigte keine Induktion von Genexpressionen. Bei Stimulation mit zuvor mit rekombinanter RNase 7 inkubiertem Poly(I:C) zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 50 ng/ml rekombinanter RNase 7 signifikante Abfälle der Genexpressionen, bei einer Konzentration von 250 ng/ml gab es bei keinem der gemessenen Gene eine signifikante Induktion der Expression mehr. Es erfolgte der Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative TSLP-I Genexpression bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle. (n.s. = nicht signifikant; *p < 0,05, ***p < 0,001; A, E: Kruskal-Wallis-Analyse mit Dunn-Korrektur; B-D: einfaktorielle ANOVA-Analyse mit Holm-Sidak-Korrektur).

4.4 siRNA Versuche

Zur Untersuchung des endogenen Einflusses von RNase 7 sowie des Ribonukleaseinhibitors auf kutane Entzündungsprozesse wurden NHEK mit spezifischer RNase 7 sowie spezifischer RI-siRNA behandelt.

4.4.1 R7-siRNA

Die Transfektion der NHEK mit RNase 7 spezifischer siRNA resultierte in einem „KnockDown“ von 75 % (Abb. 15A). Der Einfluss der RNase 7 auf Entzündungsprozesse der Haut wurde im Anschluss durch die Stimulation mit Poly(I:C) sowie Messungen verschiedener proinflammatorischer Zytokine untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die zuvor mit RNase 7-siRNA transfizierten NHEK im Vergleich zu NHEK, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, signifikant stärkere Induktionen der Genexpressionen von TSLP-I (Abb. 15B), TNF- α (Abb. 15C), IL-6 (Abb. 15D), IL-8 (Abb. 15E) und IL-17c (Abb. 15DF) aufweisen.

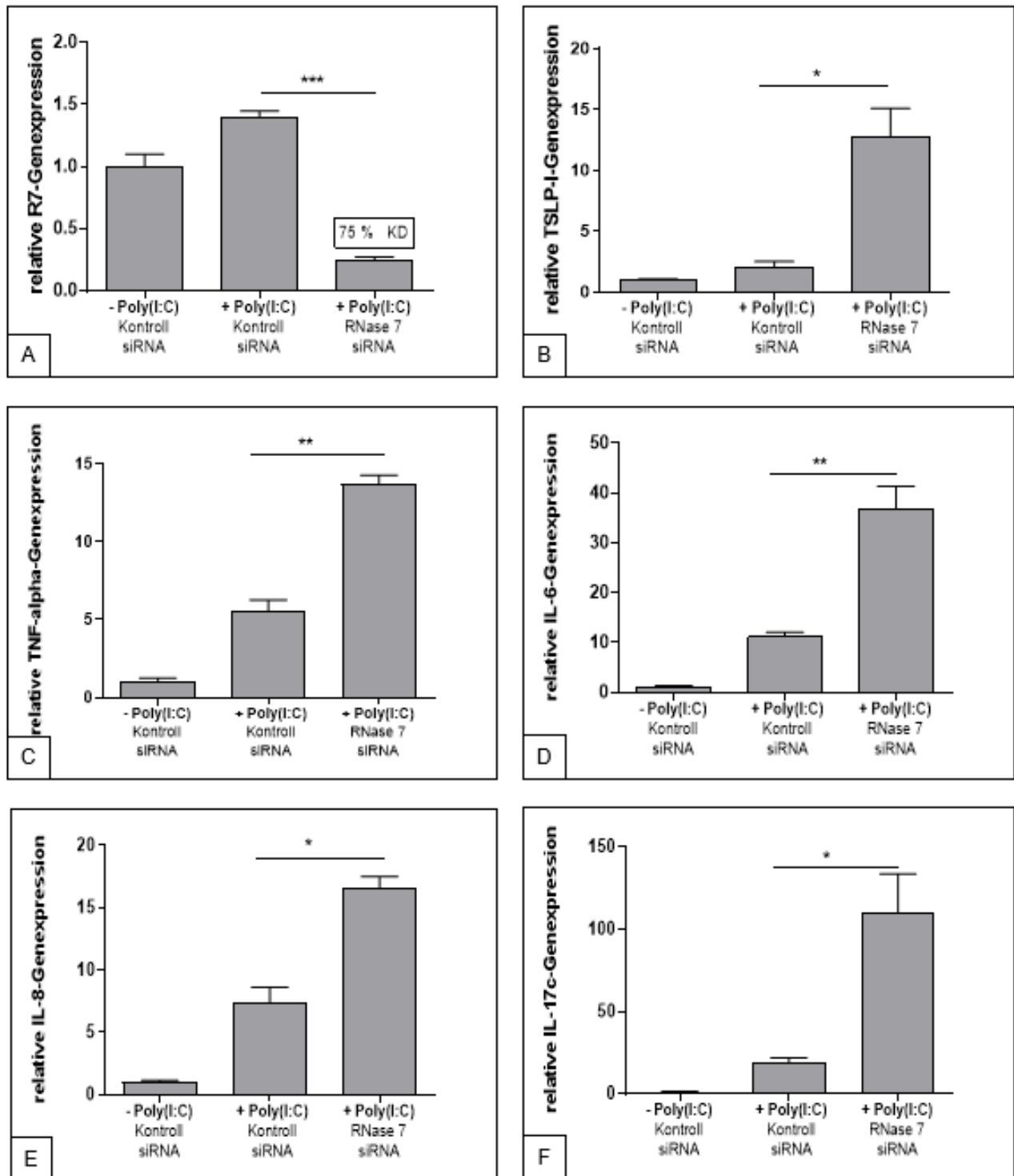


Abbildung 15: Die Poly(I:C) induzierten Genexpressionen von TSLP-I (B), TNF- α (C), IL 6 (D), IL-8 (E) und IL-17c (F) werden durch RNase 7-siRNA positiv beeinflusst.

Postkonfluente NHEK wurden mit RNase 7 spezifischer siRNA transfiziert und im Anschluss für 24 h mit 200 ng/ml Poly(I:C) stimuliert. Es wurde ein „KnockDown“ (KD) von 75% (A) erzielt. Es erfolgte der Vergleich mit NHEK, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Anschließend wurde mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relative Genexpression verschiedener Entzündungsmarker (B-F) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (*p < 0,05, **p < 0,01; ***p < 0,001 Student's *t*-Test).

4.4.2 RI-siRNA

Die Transfektion der NHEK mit RI spezifischer siRNA resultierte in einem „Knock-Down“ von 88 % (Abb. 16A). Simultan zu den Versuchen mit RNase 7 spezifischer siRNA wurden auch hier Messungen verschiedener proinflammatorischer Zytokine vorgenommen. Es konnte dargestellt werden, dass die Induktion der Genexpressionen von TSLP-I (Abb. 16B), TNF- α (Abb. 16C), IL-6 (Abb. 16D), IL-8 (Abb. 16E) und IL-17c (Abb. 16F) bei Stimulation mit Poly(I:C) bei zuvor mit RI-siRNA transfizierten NHEK deutlich schwächer ausfällt als bei NHEK, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren.

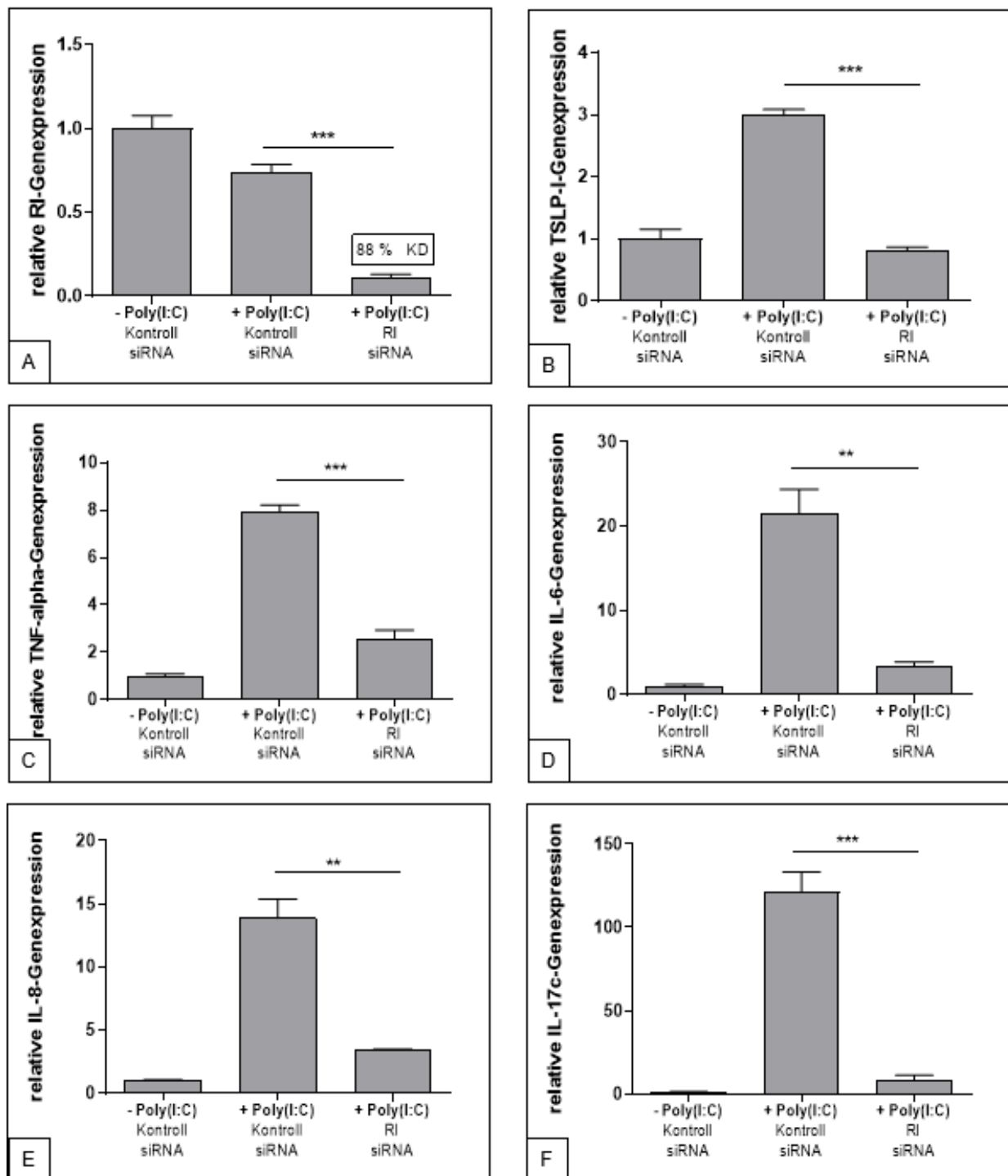


Abbildung 16: Die Poly(I:C) induzierten Genexpressionen von TSLP I (B), TNF- α (C), IL-6 (D), IL-8 (E) und IL-17c (F) werden durch RI siRNA negativ beeinflusst.

Postkonfluente NHEK wurden mit RI spezifischer siRNA transfiziert und im Anschluss für 24 h mit 200 ng/ml Poly(I:C) stimuliert. Es wurde ein „KnockDown“ (KD) von 88% (A) erzielt. Anschließend wurden mittels quantitativer „RealTime“ PCR die relativen Genexpressionen verschiedener Entzündungsmarker (B-F) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelwerten mit Standardabweichung $\pm$ SEM. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Vergleich der Proben mit der Kontrolle (*p < 0,05; ***p < 0,001; A-C, F: Student's *t*-Test; D, E: Mann-Whitney-Test).

4.5 RNase 7 Assays

In einem letzten Schritt sollte der dritten Hypothese (Abb. 6) nachgegangen und damit der Einfluss freier DNA auf die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 evaluiert werden.

Es wurde ein RNase 7 Assay mit dem fluoreszierenden Substrat 6-FAM~dArU~dAdA~6-TAMRA durchgeführt (Abb. 17). In der Positivkontrolle mit ausschließlich RNase 7 wurde deutlich, dass das Substrat durch RNase 7 gespalten wird und dadurch fluoresziert. Ab einer Konzentration von 1 µg DNA ist keine Fluoreszenz mehr sichtbar, hier scheint die RNase 7 nicht mehr das Substrat spalten zu können.

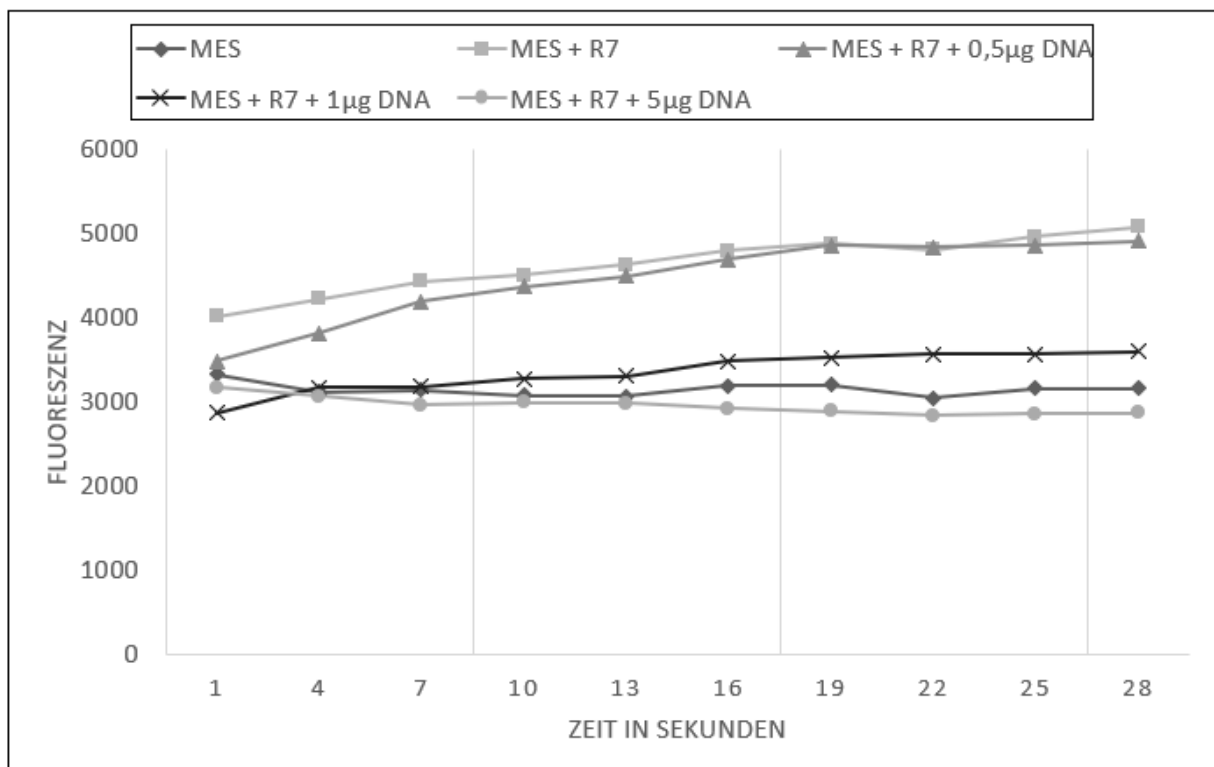
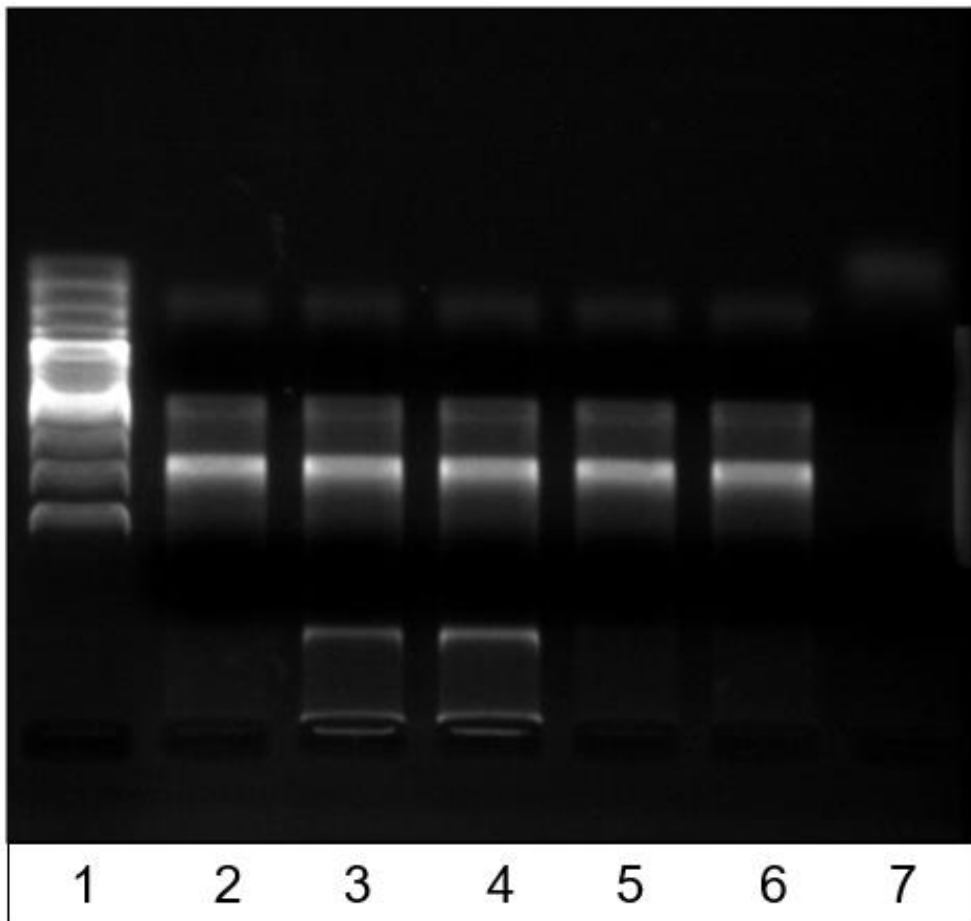


Abbildung 17: Freie DNA hat negativen Einfluss auf die Aktivität der Ribonuklease 7

Es wurde ein RNase 7 Assay mit dem fluoreszierenden Substrat 6-FAM~dArU~dAdA~6-TAMRA durchgeführt. Eingesetzt wurden eine Negativkontrolle, bestehend aus MES-Puffer, eine Positivkontrolle, bestehend aus MES-Puffer und 300 ng/µl RNase 7 sowie Proben bestehend aus dem Puffer, 300 ng/l RNase 7 und DNA (hier wurden 0,5 µl, 1 µl und 5 µl verwendet). Die Ansätze wurden gevortext und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze komplett in eine 96-well Platte pipettiert, das Substrat hinzugegeben und die Messung mit dem Mikroplattenreader Tecan i-control bei einer Extinktionswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm gestartet.

Die in diesem Assay gewonnenen Erkenntnisse sollten mit Hilfe eines weiteren Assays belegt werden. Hierzu wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit RNase 7 und freier DNA durchgeführt (Abb. 18). Auch hier konnte gezeigt werden, dass die vorherige Inkubation mit freier DNA Einfluss auf die Ribonukleaseaktivität von RNase 7 hat. In Bande 2 sind die Banden der RNA sichtbar, welche in Bande 7, bei vorheriger Inkubation mit RNase 7, nicht mehr sichtbar sind. Hier wurde die RNA durch RNase 7 degradiert. In den Banden 3 und 4 wurde jeweils 2 µg RNA und 1 µg DNA eingesetzt. Obwohl in Bande 4 zusätzlich 200 ng RNase 7 verwendet worden ist, fand hier keine Degradierung der RNA statt. Dies ist daran zu erkennen, dass die RNA Bande weiterhin sichtbar ist. Zusätzlich sind in den Banden 3 und 4 die DNA-spezifischen Banden sichtbar. Bei dem Einsatz von 0,5 µg und 0,25 µg DNA (Banden 5 und 6) sind die DNA-spezifischen Banden zwar nicht mehr sichtbar, die Ribonukleaseaktivität scheint jedoch auch hier blockiert worden zu sein, da die RNA-Banden weiterhin zu sehen sind.



- 1: Marker
- 2: 2 µg RNA
- 3: 2 µg RNA + 1 µg DNA
- 4: 2 µg RNA + 1 µg DNA + 200 ng R7
- 5: 2 µg RNA + 0,5 µg DNA + 200 ng R7
- 6: 2 µg RNA + 0,25 µg DNA + 200 ng R7
- 7: 2 µg RNA + 200 ng R7

Abbildung 18: Freie DNA hat negativen Einfluss auf die Aktivität der Ribonuklease 7, Bild II

Die zu testenden Proben wurden in den gewünschten RNA-Konzentrationen mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubationszeit wurde zum Abstoppen der Reaktion 5 µl Formamid hinzugegeben. Zu jedem Ansatz wurden 5 µl 6fach Ladepuffer hinzugefügt und die Proben in die Kammern aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über 60 min konstant bei 100 V. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die RNA- bzw. DNA-Banden mit dem interkalierenden Ethidiumbromid bei 266 nm detektiert und mit Hilfe einer BioDoc Fotodokumentationsanlage digital dokumentiert.

5. Diskussion

Es war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der RNase 7 auf kutane Entzündungsreaktionen zu untersuchen. Hierbei wurde zum einen die Interaktion zwischen der RNase 7 und freier RNA und zum anderen die Wechselwirkungen zwischen der RNase 7 und dem RI sowie freier DNA untersucht. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die RNase 7 in der Lage ist RNA zu degradieren und dadurch einen negativen Einfluss auf die Höhe der Entzündungsantwort von Keratinozyten hat. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Blockade von RNase 7 einen positiven Einfluss auf die Höhe der Entzündungsantwort haben muss. Durch die Auswertung weiterer Ergebnisse konnte die These, dass sowohl der RI als auch freie DNA durch Bindung der RNase 7 Einfluss auf die Entzündungsantwort haben, bestätigt werden. RNase 7 nimmt somit großen Einfluss auf die Höhe der Entzündungsantwort der Haut und kann selbst, durch verschiedene Faktoren, sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden.

5.1 Freie RNA steigert die Höhe von kutanen Entzündungsantworten

In dem ersten Teil dieser Arbeit ging es darum, zu zeigen, dass freie RNA zu erhöhten kutanen Entzündungsreaktionen führt. Hierzu wurden Konzentrations- und Zeitkinetiken durchgeführt, in welchen NHEK mit Poly(I:C) stimuliert worden sind. Im ersten Schritt, der Durchführung von Konzentrationskinetiken, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Poly(I:C) konzentrationsabhängig zur Induktion der Genexpression von TSLP-I, TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-17c führt (Abb. 8). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutige, konzentrationsabhängige Induktionen der untersuchten Gene. Lediglich die Genexpression von TSLP-s blieb auch bei der Stimulation mit hohen Konzentrationen Poly(I:C) unverändert (Abb. 7). Auf Proteinebene konnte bei Stimulationen mit 200 ng/ml Poly(I:C) ebenfalls eine signifikante Induktion von TSLP aufgezeigt werden (Abb. 10D). Durch diese Versuche konnte die bereits von Kinoshita *et al.* und Le *et al.* beschriebene, mehr als zehnfache Induktion von TSLP sowie anderen Zytokinen und Chemokinen bei Stimulation mit Poly(I:C) reproduziert werden (Kinoshita *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010).

Anhand der Ergebnisse lassen sich des Weiteren die erstmals 2008 von Harada *et al.* beschriebenen Unterschiede zwischen der kurzen und der langen Form von TSLP belegen (Harada et al., 2009). Simultan zu seinen Versuchen ergaben sich auch bei den hier vorliegenden Stimulationen mit Poly(I:C) erhöhte Genexpressionen von TSLP-I, allerdings nicht von TSLP-s.

Wie von Varricchi *et al.* bereits beschrieben, führen inflammatorische Prozesse zur Hochregulation der TSLP-I-Genexpression, allerdings nicht zu einer veränderten TSLP-s-Genexpression (Varricchi et al., 2018). Diese Tatsache ist darauf zurück zu führen, dass TSLP-s konstitutionell exprimiert wird und homöostatische sowie antibakterielle Eigenschaften aufweist (Xie et al., 2012). Im Gegensatz dazu ist TSLP-I bei vielen entzündlichen Erkrankungen beteiligt (Varricchi et al., 2018). Dieser Gesichtspunkt muss bei der Beurteilung der Ergebnisse der durchgeführten ELISAs dringend berücksichtigt werden (Abb. 10).

Bei Messungen der Genexpression von TSLP kann im Gegensatz zu Messungen von TSLP auf Proteinebene zwischen der langen und der kurzen Form unterschieden werden (Varricchi et al., 2018). Aus dieser Tatsache ergaben sich Überlegungen bezüglich der Validität der Ergebnisse der durchgeführten ELISAs, da dieser nicht in der Lage ist, zwischen der langen und der kurzen Form von TSLP zu unterscheiden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Induktion von TSLP-I bei dem Versuch zur Konzentrationskinetik so hoch war, dass sich dies auch in Messungen auf Proteinebene darstellen ließ.

Demgegenüber stehen die Messungen zur Zeitkinetik bei Stimulationen mit Poly(I:C) (Abb. 9 und 10). Während sich bereits nach einer achtstündigen Stimulation mit Poly(I:C) eine signifikante, etwa 15-fache Induktion der TSLP-I-Genexpression ausmachen ließ, konnte auf Proteinebene erst bei einer Stimulationsdauer von 24 h eine signifikante Induktion nachgewiesen werden. Die Höhe der Induktion von TSLP-I bzw. TSLP-s hingegen fielen auf Gen- und Proteinebene ähnlich hoch aus. Dieser Sachverhalt weist darauf hin, dass die Induktion von TSLP-I auf Proteinebene nur dann messbar ist, wenn diese sehr hoch ausfällt. Man könnte daher darauf schließen, dass die Induktion von TSLP-I bei Stimulationen mit niedrigeren Poly(I:C)-Konzentrationen nicht hoch genug ausfällt.

Da bei den ELISAs nicht zwischen der kurzen und der langen Form unterschieden werden kann und nur die lange Form von TSLP induziert wird, war dieser Anteil möglicherweise zu gering, um eine signifikante Induktion auf Proteinebene darstellen zu können. Da in dieser Arbeit der potentielle Zusammenhang zwischen der RNase 7 und der entzündlichen Hauterkrankung AD untersucht wurde, lag bei der Darstellung der Ergebnisse der Fokus neben TSLP-I auf den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-17c.

Proinflammatorische Zytokine sind die ersten Faktoren, die als Antwort auf exo- und endogene Hautschädigungen produziert werden. Sie regulieren die Funktion von Immunzellen bei Epithelialisierungen und nehmen an Entzündungsprozessen teil, in dem sie nachfolgende Signalkaskaden aktivieren (Idriss und Naismith, 2000; Xiao et al., 2020).

Durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse lässt sich der Schluss ziehen, dass freie RNA eine wichtige Rolle bei kutanen Entzündungsprozessen spielt. Darlegen lässt sich dies sehr anschaulich durch die konzentrationsabhängige Induzierbarkeit der gemessenen Zytokine (Abb. 8). Diese Erkenntnis deckt sich mit den bereits vorhandenen Forschungsergebnissen (Kawasaki et al., 2011; Kinoshita et al., 2009; Le et al., 2010; Shin et al., 2017).

5.2 Zeitlicher Ablauf von kutanen Entzündungsantworten

Die Versuche zur Zeitkinetik machen deutlich, dass die Dauer der Stimulation mit Poly(I:C) ein Faktor ist, welcher die Höhe der Entzündungsantwort maßgeblich beeinflusst. Es ist auffallend, dass die Höhe der Induktion von TSLP-I zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich hoch ausfällt.

Auch andere Forschungsgruppen haben bereits bei Messungen verschiedener proinflammatorischer Zytokine im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen sowie Heilprozessen der Haut eine zweigipflige Dynamik festgestellt. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Grellner Hautproben, welche während Operationen angefallen waren. Sie führten mittels Immunhistochemie Messungen der Zytokine IL-6, IL-1 β sowie TNF- α durch und verglichen die Werte der zuvor inzidierten Haut mit intakter Kontrollhaut.

Sie konnten zeigen, dass sich die Konzentration der Zytokine bei Messungen der inzidierten Haut zweigipflig darstellt. So erreichte beispielsweise die Konzentration von IL-6 nach einer Stunde ihren ersten Höhepunkt, fiel nach einigen Stunden ab und stieg nach einigen Tagen wieder an (Grellner, 2002). Die Untersuchungsergebnisse der Arbeitsgruppe um Sato und Oshimana zeigen ein ähnliches Bild: Sie führten nach der Inzision von Mäusehaut mittels Echtzeit-PCR Messungen der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α durch. Die Höhepunkte der Zytokine stellten sich jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten dar. Auffallend war jedoch, dass die Konzentration von TNF- α nach einem ersten Höhepunkt nach einer Stunde abfiel sowie nach etwa drei Tagen erneut anstieg (Sato und Ohshima, 2000). Ähnliche Ergebnisse hatte die Arbeitsgruppe um Kondo und Oshimana bereits einige Jahre zuvor erhoben: Sie haben bei dem Wundheilungsprozess von Mäusehaut feststellen können, dass es bei den Zytokinen IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α zu einem Rebound nach etwa 72 h kommt (Kondo und Ohshima, 1996).

Die bei der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche lassen sich auf Grund der hier durchgeführten Zellkultur und der sich dadurch unterscheidenden Untersuchungsbedingungen nicht auf die Versuche von Grellner *et al.* und Sato und Oshima *et al.* übertragen.

Eine mögliche Begründung der in den vorliegenden Versuchen dargestellten zweigipfligen Stimulationsantwort lässt sich in der sekundären Stimulation finden, welche bei einer Stimulationsdauer von 24h neben der autokrinen und parakrinen Stimulation eine Rolle spielt.

Auf Grund des Fokus der Arbeit auf den Einfluss der RNase 7 auf die kutanen Entzündungsprozesse der Haut, wurden hier keinen weiteren Untersuchungen durchgeführt. Welche Faktoren in den vorliegenden Untersuchungen die zweigipflige Entzündungsantwort beeinflussen, bleibt beim Abschluss der Arbeit nicht sicher geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3 Ein atopisches Zytokinmilieu verstärkt die Entzündungsantwort von Keratinozyten

Bei den Zytokinen IL-4 und IL-13 handelt es sich um zwei verwandte Typ-2 Zytokine, welche beide an der α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors ansetzen und viele Aspekte von allergischen Entzündungen regulieren (Junttila, 2018; Matsunaga und Yamauchi, 2016; Munera-Campos und Carrascosa, 2020). Sie sind bei verschiedenen inflammatorischen Krankheiten von großer Bedeutung (Bieber, 2020; Matsunaga und Yamauchi, 2016; Sugaya, 2020) und spielen auch bei der inflammatorischen Hauterkrankung AD, welche unter anderem durch eine Überexpression dieser Zytokine charakterisiert ist, eine zentrale Rolle (Bieber, 2022; Kim et al., 2019; Kinoshita et al., 2009; Matsunaga und Yamauchi, 2016). Ein durch diese Überexpression hervorgerufener Effekt ist eine negative Regulierung der AMP-Expression (Harder et al., 2010; Rademacher et al., 2019) und damit eine Beeinflussung der Entzündungsantwort von Keratinozyten.

Des Weiteren sind IL-4 und IL-13 relevante Zytokine bei der Synthese von IL-31, einem wichtigen Faktor bei der Induktion von Pruritus, sowie bei der Synthese von IL-5, welches für die Rekrutierung von TH-Zellen und eosinophilen Granulozyten verantwortlich ist. Durch den verstärkt auftretenden Pruritus und das damit verbundene Kratzen entstehen bei Patienten mit AD neue Barrierschäden der Haut, welche die ohnehin schon vermehrt auftretende Kolonialisierung mit *Staphylococcus aureus* weiter begünstigen. Diese Kolonialisierung bewirkt wiederum eine erneute Antwort der TH-Zellen mit einer weiteren Überexpression von IL-4 und IL-13 (Munera-Campos und Carrascosa, 2020). In dieser Arbeit konnte der Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-13 auf die Entzündungsantwort der Keratinozyten mit Hilfe von kombinierten Stimulationen mit Poly(I:C) nachgewiesen werden. So zeigte sich eine signifikant erhöhte Induktion der TSLP-I und TNF- α Genexpression nach kombinierter Stimulation mit Poly(I:C) und Zytokinen. Somit konnte in diesem Teil der Arbeit der bereits bekannte Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-13 auf kutane Entzündungsreaktionen anschaulich illustriert werden. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse weisen Korrelationen zu den aktuellen Forschungen bezüglich systemischer Therapieformen von AD auf.

Als Schlüsselemente der Antwort von TH-Zellen, welche die Immunantwort bei Patienten mit AD triggern und kontrollieren, sind IL-4 und IL-13 schon lange Gegenstände von Forschungen zu systemischen Therapieansätzen bei AD. Nach vielen Forschungen hinsichtlich möglicher Therapieoptionen, von denen sich zu Beginn die Mehrzahl als nicht erfolgsversprechend erwiesen hatten, zeigte der Einsatz des humanen monoklonalen Antikörpers Dupilumab positive Effekte auf Patienten mit chronischer, moderater bis schwerer AD (Bieber, 2022; Katoh, 2021; Matsunaga et al., 2020). Der Einsatz des gegen den gemeinsamen Rezeptor von IL-4 und IL-13 gerichtete Antikörpers ist seit 2017 für Erwachsene mit chronischer, moderater bis schwerer AD, welche mit topischen Medikamenten nicht ausreichend therapiert werden können, empfohlen (Matsunaga et al., 2020). Seit 2019 wird Dupilumab auch in bestimmten Fällen bei Patienten mit Asthma bronchiale sowie chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen eingesetzt. Im Jahr 2020 erfolgte die Aufnahme der Dupilumabtherapie bei AD in die aktuelle Leitlinie. Gute Studiendaten bei Kindern ab dem sechsten Lebensjahr eröffnen Optionen für die erweiterte Zulassung des Antikörpers.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungsergebnisse belegen, dass kutane Entzündungsantworten sowohl von freier RNA als auch von proinflammatorischen Zytokinen beeinflusst werden. Der Einfluss von den proinflammatorischen Zytokinen IL-4 und IL-13, welche unter anderem bei der inflammatorischen Hauterkrankung AD eine Rolle spielen (Bieber, 2022; Kim et al., 2019; Kinoshita et al., 2009; Matsunaga et al., 2020) und deren Überexpression unter anderem in einer negativen Regulierung der AMP-Expression resultieren (Harder et al., 2010; Rademacher et al., 2019), sei an dieser Stelle hervorgehoben. Dieser hier gezeigte Einfluss deckt sich mit den aktuellen Forschungen zu dem Einfluss von IL-4 und IL-13 auf kutane Entzündungsreaktionen und spiegelt sich in den bereits etablierten Therapieansätzen von AD sowie der laufenden Forschung bezüglich verschiedener Therapieansätze wider.

5.4 RNase 7 nimmt durch Ribonukleaseaktivität Einfluss auf kutane Entzündungsprozesse

Der Einfluss der RNase 7 auf kutane Entzündungsprozesse wurde untersucht, in dem NHEK mit Poly(I:C) stimuliert worden sind, welches zuvor für eine Stunde mit unterschiedlich hohen Konzentrationen rekombinanter RNase 7 vorinkubiert worden ist. Die Stimulationen wurden nach vierundzwanzig Stunden beendet.

Das 2002 erstmals von Harder und Schröder beschriebene AMP RNase 7 wird in vielen verschiedenen epithelialen Geweben exprimiert und weist ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivitäten gegen verschiedene pathogene Mechanismen auf (u.a. gegen *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*) (Harder und Schröder, 2002). Wie in Abbildung 3 ersichtlich, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die RNase 7 durch eine Degradierung freier RNA zu einer verminderten Entzündungsantwort beiträgt. Die Ergebnisse der Stimulation mit Poly(I:C) und rekombinanter RNase 7 lassen den Schluss zu, dass diese Annahme korrekt ist (Abb. 14). Mit Hilfe der Stimulation mit Poly(I:C) und rekombinanter RNase 7 konnte aufgezeigt werden, dass die Induktion der Genexpression aller hier dargestellten inflammatorischen Zytokine abhängig von der Konzentration der rekombinanten RNase 7 ist.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die vierundzwanzigstündige Stimulation mit Poly(I:C), welches zuvor für eine Stunde mit 200 ng/ml rekombinanter RNase 7 vorinkubiert worden war, nur noch eine signifikante Induktion der TSLP-I-Genexpression, nicht aber eine signifikante Induktion der Genexpressionen von anderen, proinflammatorischen Zytokinen bewirkt. Bei dem Einsatz von höheren Konzentrationen rekombinanter RNase 7 ließ sich jedoch auch bei der Genexpression von TSLP-I keine signifikante Induktion mehr darstellen.

Der Einfluss von RNase 7 auf kutane Entzündungsreaktionen wurde auch mit Hilfe von spezifischer RNase 7-siRNA untersucht. Hierbei erfolgte vor der Stimulation der Keratinozyten eine Transfektion der siRNA. Dabei wurde ein durchschnittlicher „Knock-Down“ von 75 % erzielt. Verfolgt man weiterhin die Anfangshypothese, dass die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 durch die Degradierung freier RNA zu einer verminderten kutanen Entzündungsantwort führt, so müsste die Induktion der Genexpression der

proinflammatorischen Zytokine durch die Transfektion der Keratinozyten sowie die daraus resultierende verminderte Ribonukleaseaktivität höher ausfallen. Die Untersuchungsergebnisse zeigen sehr deutlich, dass die verminderte Aktivität der RNase 7 in einer verstärkten Entzündungsantwort der Keratinozyten resultiert. Der Einfluss der Ribonukleaseaktivität der RNase 7 konnte somit im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene Versuchsansätze anschaulich demonstriert werden.

5.5 Sowohl der RI als auch freie DNA verursachen eine Abschwächung der Ribonukleaseaktivität von RNase 7

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des RI mit Hilfe von siRNA Versuchen näher betrachtet. Die Transfektion mit spezifischer RI-siRNA erbrachte einen durchschnittlichen „KnockDown“ von 88 %. Im Anschluss an die Transfektion erfolgte die vierundzwanzigstündige Stimulation mit Poly(I:C). Es ist deutlich sichtbar, dass die Genexpressionen der gemessenen proinflammatorischen Zytokine bei zuvor transfizierter RNA niedriger ausfallen als bei der Kontroll-siRNA (Abb. 16). Dies lässt den Schluss zu, dass es eine Interaktion zwischen der RNase 7 und dem RI gibt. Der Einfluss des Ribonukleaseinhibitors auf die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 wurde bereits untersucht. So ist bekannt, dass der RI, ebenso wie die RNase 7, von Keratinozyten produziert wird. Des Weiteren ist bekannt, dass der RI Einfluss auf die Ribonukleaseaktivität und die antimikrobielle Aktivität der RNase 7 hat (Abtin et al., 2009; Simanski et al., 2012; Zasloff, 2009).

Der RI ist in der Lage, eins zu eins Bindungen mit einigen Mitgliedern der RNase A Superfamilie, darunter den RNasen 5 und 7, einzugehen und dadurch deren enzymatische Aktivität zu inhibieren. Abtin *et al.* konnten dies demonstrieren, indem sie Vorinkubationen der RNasen 5 und 7 mit dem RI durchführten und anschließend die antimikrobielle Aktivität der RNasen maßen. Sie konnten zeigen, dass die Vorinkubation mit dem RI in einer schwächeren antimikrobiellen Aktivität resultiert (Abtin et al., 2009). Abtin *et al.* vermuteten, dass der RI von absterbenden Keratinozyten in die Umgebung des *Stratum corneums* abgegeben wird und dort mit verschiedenen Enzymen Komplexe bildet.

Seine Hypothese war, dass der RI diese Bindung unter anderem mit der RNase 7 eingeht und dadurch die katalytischen und antimikrobiellen Eigenschaften der RNase 7 verloren gehen.

Übereinstimmend dazu ergaben die Untersuchungen von unterschiedlichen Forschungsgruppen, dass die Konzentration des RI im *Stratum corneum* deutlich niedriger ist als in anderen Schichten der Epidermis bzw. dass der RI im *Stratum corneum* gar nicht nachweisbar ist. Die in einer naturwissenschaftlichen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe gezeigten Versuche von Lena Schröder aus dem Jahr 2018 belegten simultan zu den bereits vorhandenen Forschungsergebnissen, dass der RI mittels Antikörper im *Stratum corneum* nicht nachweisbar ist. In einem anderen Versuch wurde der RI über Nacht mit *Stratum corneum* Extrakt inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass der RI am darauffolgenden Tag nicht mehr nachweisbar war. Aus dieser Tatsache zog Lena Schröder die Schlussfolgerung, dass der RI über Nacht abgebaut worden ist (Schröder, 2018). Diese These deckt sich auch mit den 2019 von Rademacher *et al.* durchgeführten Untersuchungen. Auch sie schlussfolgerten, dass der RI durch Proteasen im *Stratum corneum* abgebaut wird (Rademacher et al., 2019). Im Zuge dessen würde die RNase 7 wieder freigesetzt werden und könnte dadurch wieder katalytisch und antimikrobiell aktiv sein (Abtin et al., 2009; Zasloff, 2009).

Diese Annahmen decken sich mit den hier vorliegenden Untersuchungsergebnissen. So kann davon ausgegangen werden, dass die Herunterregulation des RI durch siRNA, welche zu einer verminderten Aktivität des RI führt, bewirkt, dass die Konzentration freier RNase 7 steigt und damit der Anteil freier RNase 7, welcher antimikrobiell aktiv sein kann, höher ausfällt. Dies führt wiederum dazu, dass mehr freie RNA degradiert werden kann und dadurch die kutane Entzündungsantwort niedriger ausfällt (Abb. 5).

Aufgrund der Ergebnisse ergaben sich folgende weitere Fragen: Ist die Konzentration des RI auf der Haut von Patienten mit AD erhöht bzw. ist die Aktivität des RI bei Patienten mit AD verstärkt? Stellt der RI eventuell einen möglichen Angriffspunkt für die Therapie von kutanen Infektionen dar, beispielsweise durch den Einsatz von Proteasen, welche den RI abbauen könnten? An dieser Stelle empfehlen sich diesbezüglich weitere Untersuchungen.

Neben dem Einfluss des RI auf die RNase 7 wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von freier DNA auf die RNase 7 untersucht. Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurde die These aufgestellt, dass freie DNA, ähnlich wie der RI, in der Lage ist, die RNase 7 zu binden und dadurch die katalytische und antimikrobielle Aktivität der RNase 7 einzuschränken. Um die Interaktion zwischen freier DNA und der RNase 7 zu untersuchen, wurden zwei verschiedene RNase 7 Assays durchgeführt (Abb. 17 und 18)). Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die vorherige Inkubation der RNase 7 mit freier DNA die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 einschränkt. Dies lässt sich daran erkennen, dass die RNase 7 in der Positivkontrolle in der Lage ist, das Substrat zu spalten, was dazu führt, dass eben jenes fluoresziert. Die Inkubation der RNase 7 mit 0,5 µg DNA hatte noch keinen Einfluss auf die Fluoreszenz des Substrates. Bei einer Inkubation der RNase 7 mit 1 µg bzw. 5 µg DNA ist die RNase 7 jedoch nicht mehr in der Lage, das Substrat zu spalten, es ist keine Fluoreszenz mehr sichtbar.

Die im Anschluss durchgeführte Gelelektrophorese ergab übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 18). Bande 7 stellt hier die Positivkontrolle dar: Es ist deutlich zu erkennen, dass die in Bande 2 sichtbare RNA-Spur in Bande 7 nicht vorhanden ist. Hier hat die RNase 7 die RNA gespalten.

Die Banden 4 bis 6 zeigen, dass die RNase 7 bei einer vor der Durchführung der Gelelektrophorese durchgeführten Inkubation mit DNA nicht mehr in der Lage ist, die RNA zu spalten. Erkennbar ist dies durch die weiterhin vorhandenen Banden der RNA. Zusätzlich sind in Bande 3 und 4 die DNA-Fragmente erkennbar. Zusammenfassend lässt sich daher schlussfolgern, dass freie DNA die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 konzentrationsabhängig beeinflusst und damit Einfluss auf kutane Entzündungsreaktionen hat.

Der Einfluss von freier DNA auf die Aktivität von AMP wurde bereits unter anderem von Lande *et al.* und Kopfnagel *et al.* untersucht. Schon im Jahr 2009 beschrieben Lande *et al.* erstmals den Einfluss des Komplexes zwischen freier DNA und AMP sowie dessen Einfluss auf das Immunsystem (Lande *et al.*, 2007). Diesen Einfluss zeigten Kopfnagel *et al.* 2018 auch für die RNase 7 (Kopfnagel *et al.*, 2018).

Sie stellten die Hypothese auf, dass extrazelluläre DNA die antimikrobiellen Effekte von kationischen AMP mindert (Kopfnagel *et al.*, 2021). Um einen möglichen Einfluss

dieses Sachverhalts in Bezug auf die Infektanfälligkeit von Patienten mit AD zu untersuchen, maßen sie die Konzentrationen freier DNA auf läsionaler Haut von Patienten mit AD. Sie stellten fest, dass die Konzentration freier DNA auf läsionaler Haut von Patienten mit AD höher ist als auf nichtläsionaler Haut von Patienten mit AD bzw. Haut von Kontrollpatienten (Abb. 2).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit können einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der Interaktionen zwischen freier DNA und der RNase 7 sein. Verbindet man die von Kopfnagel *et al.* gewonnen Erkenntnisse bezüglich der erhöhten Konzentrationen freier DNA auf läsionaler Haut von Patienten mit AD mit den in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungsergebnissen bezüglich der Interaktion zwischen freier DNA und der Ribonukleaseaktivität der RNase 7, so stellt sich, ähnlich zu den Untersuchungen hinsichtlich des RI, die Frage, ob sich hier ein therapeutischer Angriffspunkt für kutane Infektionen bei Patienten mit AD auftut. Aufgrund zeitlicher Beschränkungen konnte dieser Fragestellung leider nicht weiter nachgegangen werden, daher empfehlen sich auch hier weitere Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und schützt den Organismus gegen zahlreiche externe Einflüsse (Denecker et al., 2008; Niyonsaba et al., 2017). Eine zentrale Rolle bei der Abwehrfunktion der Haut spielen die sogenannten antimikrobiellen Peptide (AMP), welche unter anderem von Keratinozyten produziert werden. Die AMP sind in den letzten Jahrzehnten, unter anderem auf Grund der vermehrten Evidenz für ihre klinische Relevanz, immer mehr in den Fokus der Wissenschaft geraten. Zu den AMP der Haut gehört die Gruppe der Ribonukleasen. Ein Vertreter dieser Gruppe, die RNase 7, stellt das zentrale Thema der hier vorliegenden Arbeit dar. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der RNase 7 für kutane Entzündungsprozesse und die eventuelle klinische Bedeutung bei der entzündlichen Hauterkrankung Atopische Dermatitis (AD) zu untersuchen.

Es konnte mit Hilfe von *in vitro* Stimulationsversuchen mit dem RNA Analogon Poly(I:C) sowie verschiedener RNase 7 Assays mittels fluoreszierendem Substrat oder Gelelektrophorese gezeigt werden, dass kutane Entzündungsreaktionen durch die Ribonukleaseaktivität von RNase 7 maßgeblich beeinflusst werden. Insbesondere die Induzierbarkeit des Zytokins TSLP-I, welches eine wichtige Rolle bei allergischen und entzündlichen Reaktionen wie Asthma bronchiale und AD spielt, zeigte einen bemerkenswerten Zusammenhang zu der Aktivität der RNase 7. Mittels spezifischer RNase 7-siRNA konnte der Einfluss der RNase 7 auf kutane Entzündungsreaktionen weiter verdeutlicht werden: Die Induzierbarkeit proinflammatorischer Zytokine zeigte sich bei zuvor herunterregulierter RNase 7 Genexpression signifikant erhöht.

Es ist bekannt, dass es verschiedene Faktoren gibt, welche die Aktivität der RNase 7 beeinflussen können. Zu diesen Faktoren zählen der Ribonukleaseinhibitor (RI) sowie freie DNA, die vermehrt auf der Haut von AD-Patienten zu finden ist. Es wurde die Hypothese untersucht, dass sowohl der RI als auch freie DNA Bindungen mit der RNase 7 eingehen und dadurch die Aktivität der RNase 7 beeinflussen können. Mittels spezifischer RI-siRNA konnte gezeigt werden, dass die Poly(I:C) -vermittelte Induktion der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen durch den RI positiv beeinflusst wird. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Induktion der Genexpression bei zuvor mit RI-siRNA transfizierten NHEK und NHEK, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Es ist bekannt, dass der RI unter anderem dazu

in der Lage ist, Bindungen mit der RNase 7 einzugehen. Die enzymatische Aktivität der RNase 7 wird durch diese Bindungen inhibiert (Abtin et al., 2009; Zasloff, 2009). So kann davon ausgegangen werden, dass die Herunterregulation des RI durch siRNA und die daraus resultierende verminderte Aktivität des RI dazu führt, dass die Konzentration freier RNase 7 ansteigt. Dies führt wiederum dazu, dass mehr freie RNA degradiert werden kann und dadurch die kutane Entzündungsantwort niedriger ausfällt.

Die Interaktion zwischen freier DNA und der RNase 7 konnte anhand verschiedener RNase 7 Assays gezeigt werden. Hierbei erfolgten vor der Durchführung der Assays Inkubationen der RNase 7 mit freier DNA. Diese Inkubationen resultierten in den durchgeführten Assays in einer verminderten Ribonukleaseaktivität der RNase 7. Es zeigte sich in beiden Assays ein konzentrationsabhängiger Einfluss von freier DNA auf die Ribonukleaseaktivität der RNase 7.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass die Ribonukleaseaktivität der RNase 7 maßgeblichen Einfluss auf kutane Entzündungsreaktionen hat. Die Ribonukleaseaktivität ist unter anderem durch den RI und freie DNA beeinflussbar. Eine vollständige Antwort auf die damit verbundene klinische Relevanz, insbesondere in Bezug auf die entzündlichen Hauterkrankung AD, kann in dieser Arbeit nicht gegeben werden. Die Resultate deuten aber stark darauf hin, dass dieser Sachverhalt von klinischer Relevanz sein könnte und gegebenenfalls auch verschiedene therapeutische Ansatzpunkte bietet. An dieser Stelle empfehlen sich weitere Untersuchungen.

Abbildung 19 stellt eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dar.

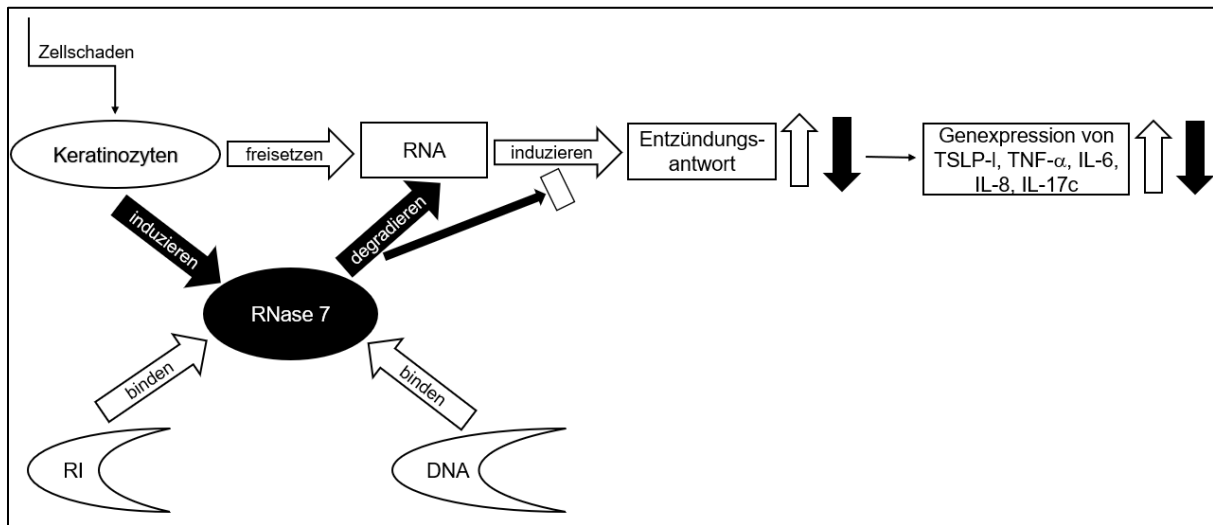


Abbildung 19: Der Einfluss der RNase 7 auf kutane Entzündungsantworten sowie die Interaktionen der RNase 7 mit dem RI und freier DNA

Kommt es zu einem Zellschaden, so setzen Keratinozyten unter anderem RNA frei. Diese führt zu einer Induktion der Entzündungsantwort, welche sich unter anderem in der erhöhten Genexpression von den proinflammatorischen Zytokinen TSLP-I, TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-17c widerspiegelt. Des Weiteren kommt es bei einem Zellschaden zu einer Induktion der RNase 7 durch die Keratinozyten. Dies führt zur Degradierung der freigesetzten RNA und damit zu einer Abschwächung der Entzündungsantwort. Der Ribonukleaseinhibitor (RI) und freie DNA sind in der Lage, Bindungen mit der RNase 7 einzugehen. Durch diese Bindungen wird die Fähigkeit der RNase 7, RNA zu degradieren, vermindert.

7. Literaturverzeichnis

- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schröder, J.-M., Tschachler, E., 2009a. Degradation by Stratum Corneum Proteases Prevents Endogenous RNase Inhibitor from Blocking Antimicrobial Activities of RNase 5 and RNase 7. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2193–2201. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.35>
- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Ghannadan, M., Harder, J., Schröder, J.-M., Tschachler, E., 2009b. Degradation by Stratum Corneum Proteases Prevents Endogenous RNase Inhibitor from Blocking Antimicrobial Activities of RNase 5 and RNase 7. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2193–2201. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.35>
- Adase, C.A., Borkowski, A.W., Zhang, L., Williams, M.R., Sato, E., Sanford, J.A., Gallo, R.L., 2016. Non-coding Double-stranded RNA and Antimicrobial Peptide LL-37 Induce Growth Factor Expression from Keratinocytes and Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 11635–11646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725317>
- Becknell, B., Eichler, T.E., Beceiro, S., Li, B., Easterling, R.S., Carpenter, A.R., James, C.L., McHugh, K.M., Hains, D.S., Partida-Sanchez, S., Spencer, J.D., 2015. Ribonucleases 6 and 7 have antimicrobial function in the human and murine urinary tract. *Kidney Int.* 87, 151–161. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.268>
- Bieber, T., 2022. Atopic dermatitis: an expanding therapeutic pipeline for a complex disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 21–40. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00266-6>
- Bieber, T., 2020. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy* 75, 54–62. <https://doi.org/10.1111/all.13954>
- Broughton, G.I., Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006. Wound Healing: An Overview. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 1e. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9>
- Cho, S., Beintema, J.J., Zhang, J., 2005. The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics* 85, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.10.008>
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *J. Cell Biol.* 180, 451–458. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709098>
- Franziska Rademacher, 2018. Untersuchungen zur Bedeutung von RNase 7 in der kutanen Abwehr. Kiel.
- Grellner, W., 2002. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Sci. Int.* 130, 90–96. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(02\)00342-0](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(02)00342-0)
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A.I., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Yoshihara, S., Ebisawa, M., Saito, H., Matsumoto, K., Nakamura, Y., Ziegler, S.F., Tamari, M., 2009. Functional Analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 368–374. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0041OC>
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T., Gläser, R., 2010.

- Enhanced Expression and Secretion of Antimicrobial Peptides in Atopic Dermatitis and after Superficial Skin Injury. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1355–1364. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.432>
- Harder, J., Schröder, J.-M., 2002. RNase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin. *J. Biol. Chem.* 277, 46779–46784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207587200>
- Idriss, H.T., Naismith, J.H., 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50, 184–195. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H)
- Junttila, I.S., 2018. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front. Immunol.* 9, 888. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>
- Katoh, N., 2021. Emerging treatments for atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 48, 152–157. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15504>
- Kawasaki, J., Ushio, H., Kinoshita, H., Fukai, T., Niyonsaba, F., Takai, T., Ogawa, H., Okumura, K., Ikeda, S., 2011. Viral infection induces Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 62, 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.02.005>
- Kim, J., Kim, B.E., Leung, D.Y.M., 2019. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Proc.* 40, 84–92. <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4202>
- Kinoshita, H., Takai, T., Anh Le, T., Kamijo, S., Ling Wang, X., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Tuan Vu, A., Ogawa, T., Gunawan, H., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H., 2009. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.008>
- Kondo, T., Ohshima, T., 1996. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: A preliminary study for possible wound age determination. *Int. J. Legal Med.* 108, 231–236. <https://doi.org/10.1007/BF01369816>
- Kopfnagel, V., Dreyer, S., Zeitvogel, J., Pieper, D.H., Buch, A., Sodeik, B., Rademacher, F., Harder, J., Werfel, T., 2021. Free human DNA attenuates the activity of antimicrobial peptides in atopic dermatitis. *Allergy* 76, 3145–3154. <https://doi.org/10.1111/all.14992>
- Kopfnagel, V., Wagenknecht, S., Harder, J., Hofmann, K., Kleine, M., Buch, A., Sodeik, B., Werfel, T., 2018. RNase 7 Strongly Promotes TLR9-Mediated DNA Sensing by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Invest. Dermatol.* 138, 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.09.052>
- Lande, R., Chamilos, G., Ganguly, D., Demaria, O., Frasca, L., Durr, S., Conrad, C., Schröder, J., Gilliet, M., 2015. Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *Eur. J. Immunol.* 45, 203–213. <https://doi.org/10.1002/eji.201344277>
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Yi-Hong, Homey, B., Cao, W., Wang, Yui-Hsi, Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., Gilliet, M., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569. <https://doi.org/10.1038/nature06116>
- Landén, N.X., Li, D., Stähle, M., 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3861–3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>

- Le, T.A., Takai, T., Vu, A.T., Kinoshita, H., Ikeda, S., Ogawa, H., Okumura, K., 2010. Glucocorticoids Inhibit Double-Stranded RNA-Induced Thymic Stromal Lymphopoietin Release from Keratinocytes in an Atopic Cytokine Milieu More Effectively than Tacrolimus. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153, 27–34. <https://doi.org/10.1159/000301576>
- Lena Schröder, 2018. Untersuchungen zur Bedeutung des humanen Ribonuklease-Inhibitors und der antimikrobiellen Ribonuklease RNase 7 für die kutane Abwehr.pdf. Kiel.
- Matsunaga, K., Katoh, N., Fujieda, S., Izuhara, K., Oishi, K., 2020. Dupilumab: Basic aspects and applications to allergic diseases. *Allergol. Int.* 69, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.01.002>
- Matsunaga, M.C., Yamauchi, P.S., 2016. IL-4 and IL-13 Inhibition in Atopic Dermatitis. *J. Drugs Dermatol. JDD* 15, 925–929.
- Melo, M.N., Ferre, R., Castanho, M.A.R.B., 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 245–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2095>
- Munera-Campos, M., Carrascosa, J., 2020. Innovation in Atopic Dermatitis: From Pathogenesis to Treatment. *Actas Dermosifiliogr.* 111. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2019.11.002>
- Niyonsaba, F., Kiatsurayanon, C., Chieosilapatham, P., Ogawa, H., 2017. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp. Dermatol.* 26, 989–998. <https://doi.org/10.1111/exd.13314>
- Rademacher, F., Dreyer, S., Kopfnagel, V., Gläser, R., Werfel, T., Harder, J., 2019. The Antimicrobial and Immunomodulatory Function of RNase 7 in Skin. *Front. Immunol.* 10, 2553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02553>
- Rademacher, F., Simanski, M., Harder, J., 2016. RNase 7 in Cutaneous Defense. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 560. <https://doi.org/10.3390/ijms17040560>
- Rademacher, F., Simanski, M., Schröder, L., Mildner, M., Harder, J., 2017. The role of RNase 7 in innate cutaneous defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp. Dermatol.* 26, 227–233. <https://doi.org/10.1111/exd.13166>
- Sato, Y., Ohshima, T., 2000. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II). *Int. J. Legal Med.* 113, 140–145. <https://doi.org/10.1007/s004140050285>
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Shin, J.-M., Choi, D.-K., Sohn, K.-C., Kim, S.-Y., Min Ha, J., Ho Lee, Y., Im, M., Seo, Y.-J., Deok Kim, C., Lee, J.-H., Lee, Y., 2017. Double-stranded RNA induces inflammation via the NF- κ B pathway and inflammasome activation in the outer root sheath cells of hair follicles. *Sci. Rep.* 7, 44127. <https://doi.org/10.1038/srep44127>
- Simanski, M., Köten, B., Schröder, J.-M., Gläser, R., Harder, J., 2012. Antimicrobial RNases in Cutaneous Defense. *J. Innate Immun.* 4, 241–247. <https://doi.org/10.1159/000335029>
- Sugaya, M., 2020. The Role of Th17-Related Cytokines in Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1314. <https://doi.org/10.3390/ijms21041314>
- Varricchi, G., Pecoraro, A., Marone, Giancarlo, Criscuolo, G., Spadaro, G., Genovese, A., Marone, Gianni, 2018. Thymic Stromal Lymphopoietin Isoforms, Inflammatory Disorders, and Cancer. *Front. Immunol.* 9, 1595. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01595>

- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., 2009. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37, 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Wang, G., 2020. The antimicrobial peptide database provides a platform for decoding the design principles of naturally occurring antimicrobial peptides. *Protein Sci.* 29, 8–18. <https://doi.org/10.1002/pro.3702>
- Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., Chen, Y.-J., 2018. Wound healing. *J. Chin. Med. Assoc. JCMA* 81, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Wikramanayake, T.C., Stojadinovic, O., Tomic-Canic, M., 2014. Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. *Adv. Wound Care* 3, 272–280. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0503>
- Xiao, T., Yan, Z., Xiao, S., Xia, Y., 2020. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 232. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01755-y>
- Xie, Y., Takai, T., Chen, X., Okumura, K., Ogawa, H., 2012. Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 66, 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.03.007>
- Zasloff, M., 2009. Antimicrobial RNases of Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2091–2093. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.216>

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Epidermis; aus (Rademacher, 2018), modifiziert nach (Dencker et al., 2008).....	2
Abbildung 2: Die Konzentration freier DNA ist auf läsionaler Haut von Patienten mit AD höher als bei Kontrollpatienten, (Kopfnagel et al., 2021)	8
Abbildung 3: RNase 7 degradiert freie RNA und bewirkt dadurch eine Abschwächung der Entzündungsantwort.....	11
Abbildung 4: Die Bindung zwischen dem RI und der RNase 7 resultiert in einer höher ausfallenden Entzündungsantwort.....	11
Abbildung 5: Bei Blockade des RI kann die freiwerdende RNase 7 RNA degradieren und somit Einfluss auf die Höhe der Entzündungsantwort nehmen.....	11
Abbildung 6: Die Bindung der RNase 7 durch freie DNA hindert die RNase 7 daran, RNA zu degradieren	12
Abbildung 7: Stimulationen mit Poly(:C) bewirken konzentrationsabhängig Induktionen der TSLP-I Genexpression (A), jedoch nicht der TSLP-s-Genexpression (B). Die Induktion von TSLP ist auch auf Proteinebene nachweisbar (C).....	32
Abbildung 8: Höhere Poly(I:C) Konzentrationen bewirken eine hohe Induktion der Genexpressionen von TNF- α (A), IL 6 (B), IL-8 (C) und IL-17c (D).....	33
Abbildung 9: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) sowie 24 h (D) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TSLP-I	35
Abbildung 10: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) sowie 24 h (D) unterschiedlich hohe Induktionen der TSLP-Konzentration.	37
Abbildung 11: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 24 h (A) und 48 h (B) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TSLP-I.....	38
Abbildung 12: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 4 h (A), 8 h (B), 16 h (C) sowie 24 h (D) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TNF- α	40

Abbildung 13: Stimulationen mit Poly(I:C) mit bzw. ohne IL-4 und IL-13 bewirken nach 24 h (A) und 48 h (B) unterschiedlich hohe Induktionen der Genexpression von TNF- α	41
Abbildung 14: Die einstündige Vorinkubation von Poly(I:C) mit rekombinanter RNase 7 hat konzentrationsabhängig Einfluss auf die Induktion der Genexpression von TSLP-I (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-8 (D) und IL-17c (E)	43- 44
Abbildung 15: Die Poly(I:C) induzierten Genexpressionen von TSLP-I (B), TNF- α (C), IL 6 (D), IL-8 (E) und IL-17c (F) werden durch RNase 7-siRNA positiv beeinflusst.	46
Abbildung 16: Die Poly(I:C) induzierten Genexpressionen von TSLP I (B), TNF- α (C), IL-6 (D), IL-8 (E) und IL-17c (F) werden durch RI siRNA negativ beeinflusst.	48
Abbildung 17: Freie DNA hat negativen Einfluss auf die Aktivität der Ribonuklease 7	49
Abbildung 18: Freie DNA hat negativen Einfluss auf die Aktivität der Ribonuklease 7, Bild II	51
Abbildung 19: Der Einfluss der RNase 7 auf kutane Entzündungsantworten sowie die Interaktionen der RNase 7 mit dem RI und freier DNA	65

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, **Annika Scheel**, dass ich die vorliegende Dissertation, mit Ausnahme von der wissenschaftlichen Konsultation durch meinen akademischen Betreuer, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Dissertation, die anderen Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen sowie für Quellen aus dem Internet.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Rademacher, F., Scheel, A., Gläser, R., Schröder, L., Heinemann, N, Bartels, J., Gerdess, S., Stölzl, D., Rodriguez, E., Döhner, K., Weidinger, S., Werfel, T., Harder, J. (2024) „Inhibition of NRase 7 inhibitor promotes inflammation and Staphylococcus aureus growth: Implications for atopic dermatitis.“ Allergy. DOI: 10.1111/all.16125

Kiel, Juli 2025

Annika Scheel

10. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen, daher möchte ich an dieser Stelle Danke sagen. Danke auch an alle, die an dieser Stelle nicht persönlich erwähnt werden.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Harder für seine jahrelange Unterstützung und die vielen neuen Anregungen, welche meine Arbeit maßgeblich beeinflusst haben. Danke für Dein Vertrauen in mich und dafür, dass ich mich mit diesem spannenden Thema auseinandersetzen durfte.

Zu dem vielen Dank an meine Betreuerin Dr. Franziska Rademacher, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte.

Nicht zu vergessen ein großes Danke an Heilwig Hinrichs und Conny Wilgus – ohne Euch hätte ich sicherlich einige Versuche mehr wiederholen müssen. Ich denke gerne an unsere wöchentlichen Salattage und den ein oder anderen gemeinsamen Kaffee zurück, ohne Euch wäre meine Zeit in der AG Harder nicht dieselbe gewesen.

Ich bin sehr dankbar, dass ich insbesondere durch meine Vollzeitarbeit Teil des Teams der AG Harder sein durfte und im Labor Einblicke in die aktuelle medizinische Forschung gewinnen konnte. Ich würde mich jederzeit wieder für diese Arbeit und die Arbeit in dieser tollen AG entscheiden. Danke!

Ein besonderer Dank geht zuletzt an meine Eltern Wiltrud und Ingo Moy sowie meinen Ehemann Jan. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich durch alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit begleitet habt.

11. Akademischer Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf hier nicht aufgeführt.

12 Veröffentlichungen

- Rademacher, F., Scheel, A., Gläser, R., Schröder, L., Heinemann, N., Bartels, J., Gerdes, S., Stölzl, D., Rodriguez, E., Döhner, K., Weidinger, S., Werfel, T., Harder, J. 2024. Inhibition of RNase 7 by RNase inhibitor promotes inflammation and *Staphylococcus aureus* growth: Implications for atopic dermatitis. *Allergy*.
- Moy, A., Rademacher, F., Weidinger, S., Harder, J., 2021. RNase 7 and the ribonuclease inhibitor regulate RNA-induced inflammatory reactions in keratinocytes. 50th ESDR Meeting, Abstract 210
- Moy, A., Rademacher, F., Wagenknecht, S., Kopfnagel, V., Werfel, T., Harder, J., 2021. Effects of RNase 7 on cutaneous RNA-induced inflammatory reactions. 47. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)