

Aus der Klinik und Poliklinik für
Allergologie und Dermatologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka

**Die Wirkung von Vitamin D3-Analoga auf die
Cathelicidin-Expression in der Haut bei Psoriasis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katrin Groß

aus
Schmalkalden

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Jürgen Schauber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Klaus Degitz Prof. Dr. med. Helmut Kreppel
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Yvonne Dombrowski, Dr. rer. nat. Mark Peric
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2010

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Antimikrobielle Peptide	9
1.1.1 Cathelicidin.....	12
1.1.2 Weitere AMP	14
1.1.3 AMP in Hauterkrankungen	14
1.2 Psoriasis.....	16
1.2.1 Cathelicidin und Psoriasis	17
1.2.2 Therapie der Psoriasis.....	20
1.3 1,25 Vitamin D3.....	22
1.4 Vitamin D3-Analoga	26
1.5 Ziel der vorliegenden Untersuchung.....	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Hautproben von Patienten.....	31
2.1.2 Zellen und Zellkultur	31
2.2 Analysemethoden.....	32
2.2.1 Analyse der Zellsignalwege durch Stimulation und Transfektion	32
2.2.2 Plasmidisolierung und Reporteranalyse.....	33
2.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	34
2.2.4 Western-Blot	36
2.2.5 Immunhistochemie	39
2.2.6 Immunfluoreszenz	39
2.3 Statistische Analyse	40
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Expression von antimikrobiellen Peptiden und IL-17A in lässionaler psoriatischer vs. gesunder Haut nach Behandlung mit Calcipotriol.....	41
3.2 Effekte von Vitamin D3-Analoga auf die Cathelicidin-Expression in kultivierten Keratinozyten	44
3.3 Auch Vitamin D3-Analoga wirken über den Vitamin D3-Signalweg.....	48
3.3.1 Vitamin D3-Analoga wirken über den Vitamin D-Rezeptor.....	48
3.3.2 Der MEK/ERK-Signalweg ist beteiligt an der Wirkung der Vitamin D3-Analoga.....	51
3.3.3 IL-17A verstärkt die Effekte von Vitamin D3 und dessen Analoga auf die Cathelicidin-Expression.	53
4 Diskussion	55
4.1 Antimikrobielle Peptide in lässionaler psoriatischer Haut.....	55

4.2	Vitamin D3-Analoga und deren Einfluss auf die Expression antimikrobieller Peptide <i>in vivo</i>	55
4.3	Einfluss verschiedener Vitamin D3-Analoga auf die Expression antimikrobieller Peptide <i>in vitro</i>	57
4.4	Signaltransduktionsmechanismus der Vitamin D3-Analoga.....	59
4.5	Wirkung von IL-17A auf die Induktion der Cathelicidin-Expression durch Vitamin D3-Analoga	60
4.6	Vitamin D3-Analoga als mögliche Therapeutika	60
5	Zusammenfassung	62
6	Abkürzungsverzeichnis	65
7	Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	69
8	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	78

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Bestandteile der angeborenen Immunabwehr. Es handelt sich um niedermolekulare, kationische Oligo- bis Polypeptide. Sie werden von verschiedensten Zellen unterschiedlicher Lebewesen, wie Vertebraten, wirbellosen Tieren, Insekten, Pflanzen und Bakterien produziert und haben vielfältige Funktionen (1). Im humanen Organismus ist die Expression von AMP je nach Gewebe- und Zelltyp sehr unterschiedlich. Oft werden sie in interagierenden Gruppen sezerniert. In der Haut sind beispielsweise mehr als 20 verschiedene Arten von antimikrobiellen Peptiden und Proteinen bekannt (2). Sie werden nach bestimmten gemeinsamen Merkmalen in Gruppen eingeteilt. Die wichtigsten Vertreter im menschlichen Organismus sind die Defensine, wie beispielsweise die humanen β -Defensine-2 und -3 (hBD-2 und hBD-3), die Histatine, Psoriasin und Cathelicidin.

Antimikrobielle Peptide sind gencodiert. Das heißt, ein Gen codiert für ein Peptid (3). Das Cathelicidingen, aus welchem letztendlich LL-37 generiert wird, liegt auf Chromosom 3 und besteht aus 4 Exons (3). Das erste translationale Produkt ist ein Präpropeptid, bestehend aus einer N-terminalen Signalsequenz, um das endoplasmatische Retikulum anzusteuern, einem Prosegment und einem C-terminalen kationischen Peptid. Dieses besitzt nach der Spaltung antimikrobielle Eigenschaften. Beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum wird die N-terminale Sequenz abgespalten. Das Prosegment ist oft anionisch und hat diverse Funktionen, darunter auch die Hemmung der Aktivität des reifen kationischen Peptids aufgrund seiner Ladung. Im Rahmen späterer intrazellulärer Prozessierung oder nach der Sekretion in den Extrazellularraum wird das Propeptid gespalten und das reife und antimikrobiell wirksame C-terminale Peptid freigesetzt (3).

Durch ihre Wirkungsweisen lassen die AMP darauf schließen, dass es sich um eine Art körpereigener Antibiotika handelt. Einige AMP ändern die Beschaffenheit der Membranen der Wirtszellen oder interagieren mit ihren Rezeptoren und beeinflussen damit bestimmte zelluläre Prozesse (4). Sie verfügen über eine breit gefächerte antimikrobielle Aktivität gegen gram-positive und -negative Bakterien, Pilze und behüllte Viren. Diese antimikrobielle Aktivität der AMP ist auf die Zerstörung der jeweiligen Membran als Schutzbarriere zurückzuführen (Abbildung 1). Dabei werden die kationischen AMP durch elektrostatische Kräfte von den negativ geladenen Phospholipidgruppen ange-

zogen. Diese sind typischerweise Teil der kapsulären Polysaccharide auf den Membranoberflächen der meisten Bakterien. Hierzu gehören unter anderem Lipopolysaccharide (LPS), Teichonsäure und Lipoteichonsäure (4). Zunächst erhalten die AMP Zugang zum Zellinneren, indem sie mit der Lipiddoppelschicht interagieren (5), gefolgt von einem Auslösen der Lipide, welches zu einer Änderung der Membranstuktur führt. Diese Vorgänge resultieren in der Bildung einer Pore in der Membran, durch die nun Zellkomponenten austreten können und den Zelltod verursachen (4).

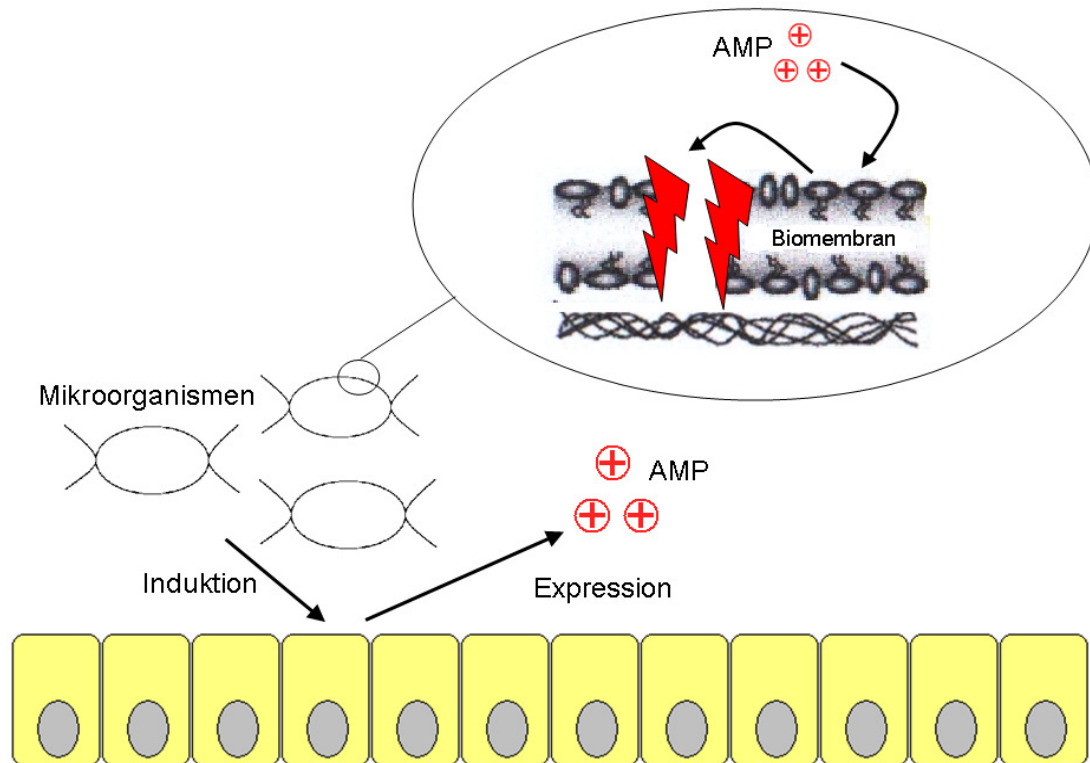


Abbildung 1: Antimikrobielle Funktion der AMP. Nach elektrostatischen Interaktionen zwischen den positiv geladenen, antimikrobiellen Peptiden und den negativ geladenen Phospholipiden der Bakterienmembran entstehen Poren durch Strukturveränderungen und anschließendem Herauslösen der Lipide. Infolgedessen können Zellkomponenten austreten und zum Tod der Bakterien führen (adaptiert nach (3)).

Die minimale inhibitorische Konzentration liegt im Bereich zwischen 0,1-100µg/ml (3). Sie ist *in vitro* weitaus höher als die unter physiologischen Bedingungen *in vivo* tatsächlich gefundenen Konzentrationen. Beispielsweise liegt die Konzentration von LL-37 und β -Defensinen auf Schleimhäuten unter 2µg/ml, während die minimale inhibitorische Konzentration von LL-37 *in vitro* für *Escherichia coli* bei mehr als 32µg/ml liegt (4). Der Grund für ihre dennoch enorme Wirksamkeit liegt unter anderem in den synergistischen Aktivitäten mit anderen Klassen von AMP, sowie mit anderen Abwehrmolekülen wie Lysozym und Lactoferrin (3).

AMP unterstützen die Immunabwehr jedoch nicht nur durch simples Töten von Krankheitserregern, sondern wirken als potente Immunregulatoren auch durch indirekte Me-

chanismen (Abbildung 2). Um die vielen verschiedenen Funktionen der AMP als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems zusammenzufassen, wurde der Begriff „Alarmin“ geprägt (6). Sie steuern die Genexpression im Sinne entsprechend notwendiger Abwehrvorgänge, agieren als Chemokine bzw. induzieren die Chemokinproduktion und hemmen die LPS- oder Hyaluronsäure-induzierte proinflammatorische Zytokinproduktion. Dies geschieht beispielsweise durch Bindung und Neutralisation von LPS (7), welches abgefangen wird, bevor es die Entzündungsreaktion auslösen kann (4). Außerdem unterstützen sie die Wundheilung und modulieren die Reaktionen des adaptiven Immunsystems über ihre Wirkung auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten. Durch diese vielfältigen Funktionen schlagen antimikrobielle Peptide eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (4).

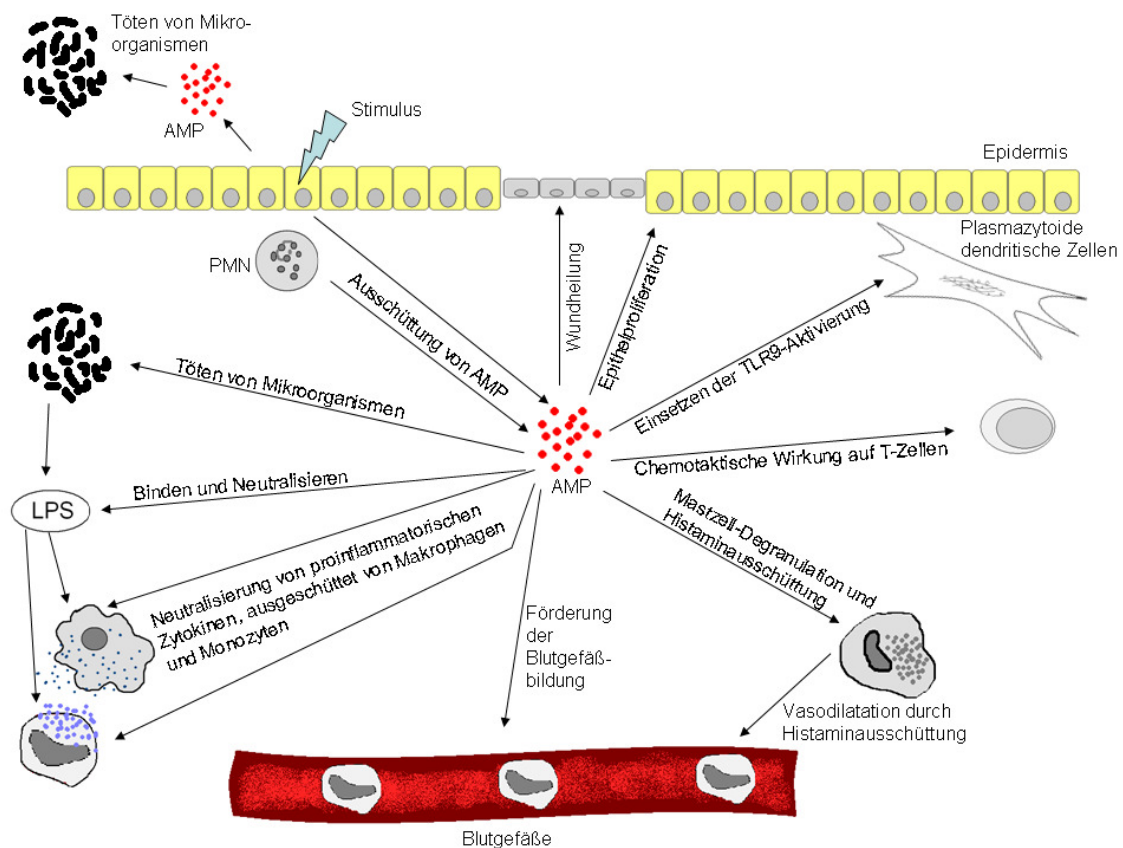


Abbildung 2: Verschiedene Funktionen antimikrobieller Peptide im Rahmen der Immunabwehr. AMP lösen eine Vielzahl von Antworten in verschiedenen Zellen der körpereigenen Abwehr aus, zum Beispiel in Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und Epithelzellen. Sie beeinflussen die Genexpression der entsprechenden Zellen, induzieren die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, beeinflussen die Zelldifferenzierung und vieles mehr. Diese gezielten Vorgänge im Rahmen einer Immunmodulation führen letztlich zu Antworten der adaptiven Abwehr und so zum Schutz vor Infektionen. Die gezielte Kontrolle der Entzündungsreaktion, die Förderung der Wundheilung und das Einsetzen von adaptiven Immunreaktionen charakterisieren die vielfältigen Funktionen der AMP (adaptiert nach (4)).

Wenn die Wirkung der AMP aber über eine Interaktion mit Lipiden der Zellmembranen funktioniert, stellt sich die Frage, warum diese Stoffe nicht ebenfalls eine toxische Wirkung auf die körpereigenen Zellen haben. Hierzu gibt es zum jetzigen Zeitpunkt mehrere Hypothesen: Zunächst wird angenommen, dass AMP, die von Säugern produziert werden, nicht mit eukaryontischen Zellen interagieren, da diese einen Cholesterolanteil in ihren Zellmembranen haben (8). Cholesterol ist bekannt für seine Eigenschaft, Phospholipiddoppelschichten zu kondensieren. Das könnte AMP daran hindern, die eukaryontischen Zellmembranen zu durchdringen. Im Gegensatz dazu sind bakterielle Zellmembranen cholesterolfrei. Neben der Anwesenheit von Cholesterol könnte auch die asymmetrische Anordnung der Phospholipide in der Zytoplasmamembran der eukaryontischen Zellen zur Unempfindlichkeit gegenüber AMP beitragen. Die äußere Schicht der körpereigenen Zelle besteht aus neutralen Phospholipiden ohne Nettoladung. Die meisten negativ geladenen Lipide, die eine Affinität zu AMP hätten, sind auf der Innenseite der Membran, also dem Zytoplasma zugewandt (9, 10). Zusätzlich werden die zytotoxischen Effekte der AMP *in vivo* abgemildert durch diverse Serumkomponenten wie Apolipoprotein A-I und B, sowie andere Lipoproteine. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie LL-37 binden (4, 11).

1.1.1 Cathelicidin

Eine wichtige Gruppe antimikrobieller Peptide sind die Cathelicidine. Bei ihrer Entdeckung ging man ursprünglich davon aus, dass es sich um Abwehrmoleküle der Haut bei Menschen und Säugetieren handelt (12). Dies ist keineswegs falsch, aber es umfasst nur einen Teil der vielfältigen Funktionen, die heute bekannt sind.

Alle Cathelicidine haben eine hoch konservierte und daher ähnliche N-terminale Region, bekannt als Cathelin-Abschnitt, die aus ca. 100 Aminosäureresten besteht (13). Der C-terminale Bereich ist dagegen sehr variabel (4, 14, 15) und besitzt nach der Prozessierung die eigentliche antimikrobielle Aktivität. Es wurde nur ein menschliches Cathelicidin-Gen gefunden, welches für ein Vorläuferprotein codiert. Die Molekülmasse dieses Vorläuferproteins liegt bei ca. 18kDa, weshalb es als hCAP18 (18kDa human cationic antimicrobial protein) bezeichnet wird. Das einzige humane Mitglied der Cathelicidin-Familie ist LL-37. Es entsteht aus dem Vorläuferprotein hCAP18 durch Proteolyse am C-terminalen Ende (1). LL-37 besteht aus 37 Aminosäuren und beginnt mit zwei Leucinen. Da kein Cystein enthalten ist, hat es eine lineare Struktur. In hydrophober Umgebung bildet LL-37 eine α -Helix-Struktur aus (16). Es wird gespeichert in neutrophilen Granula in einer Konzentration von ca. $630\mu\text{g je } 10^9$ Zellen (17). Humanes Cathelicidin wird auch in anderen Granulozyten, wie Mastzellen und NK-Zellen produziert. Es wird außerdem von den Epithelzellen von Haut, Lunge, Darm, Brustdrüsen

und Epididymis exprimiert, aufgenommen und sezerniert (18–21). LL-37 kann später noch weiter zu kleineren Peptiden mit erhöhter antimikrobieller Aktivität oder anderen Signaleigenschaften prozessiert werden (22).

Als reifes Peptid, also nach Abspaltung vom C-Terminus des hCAP18-Moleküls, zeigt LL-37 eine schnell und potent wirksame, breit gefächerte antimikrobielle Aktivität (9, 23, 24). *In vivo* ist seine Prozessierung notwendig, um diese zu erreichen (25). Sie wird von Serinproteasen aus Keratinozyten, wie Kallikrein (26), und neutrophilen Granulozyten, wie Proteinase 3 (27) bewirkt. Der Mechanismus der Cathelicidin-Transkription in Keratinozyten blieb lange unklar, da klassische Entzündungsmediatoren die Expression *in vitro* nicht beeinflussen (22). Der Durchbruch beim Verständnis der Cathelicidin-Expression kam mit der Identifikation des Vitamin D-responsive Elements (VDRE) im Promoter des humanen Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)-Gens (28). Aufgrund des VDRE kann die Expression direkt durch 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (1,25D3), der aktiven Form von Vitamin D3, kontrolliert werden (22, 28). Viel wichtiger als der Einfluss von Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder Zytokinen ist also der Zusammenhang der Expression mit anderen Prozessen, wie beispielsweise der Aktivität des Vitamin D-Rezeptors (VDR), der Modulation der Vitamin D-Aktivität im jeweiligen Gewebe und einer Histonacetylierung durch Substanzen wie Butyrat (28–33). Auch eine Beteiligung des MEK/ERK-Signalwegs an der Induktion der Cathelicidin-Expression konnte inzwischen nachgewiesen werden (12).

Wegen seiner Rolle als körpereigenes Antibiotikum hat LL-37 gegenüber synthetisch hergestellten Pharmaka ausgesprochen wichtige Vorteile. Beispielsweise ist eine Resistenzentwicklung bislang nicht beobachtet worden. Zusätzlich bindet und neutralisiert es bakterielles LPS und schützt damit vor einem endotoxischen Schock, wie im Mausmodell gezeigt wurde (7). Die Funktionen von LL-37 gehen jedoch weit über die antimikrobiellen Eigenschaften hinaus. Wie viele andere AMP wirkt LL-37 in nanomolarer Konzentration chemotaktisch auf Neutrophile, Mastzellen, Monozyten/Makrophagen und CD4 T-Lymphozyten (34). Es induziert die Degranulation von Mastzellen, ändert transkriptionelle Antworten von Makrophagen und stimuliert die Vaskularisation und Re-Epithelialisierung bei der Wundheilung in der Haut (23). Außerdem löst es bei ortsständigen Hautzellen die Abgabe verschiedener Zytokine und Chemokine aus (35). Zusätzlich wurden synergistische Effekte mit IL-1 β nachgewiesen, die zu einer Erhöhung der Produktion von Zytokinen (IL-6, IL-8, IL-10) und Chemokinen, sowie der Synthese und Freisetzung von α -Defensinen führen (36). Des Weiteren ist LL-37 in der Lage, mit körpereigener DNA Komplexe zu bilden, die dann plasmazytoide dendritische Zellen über den endosomalen Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) zur Bildung von Typ1-Interferonen stimulieren (37).

1.1.2 Weitere AMP

Defensine sind kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3,5 – 4,5kDa. Sie enthalten sechs Cystein-Reste, die sich zu drei charakteristischen Disulfidbrücken zusammenschließen (38). Basierend auf der Position dieser intramolekularen Disulfidbrücken werden sie eingeteilt in α -, β -, und θ -Unterfamilien. (39). In menschlichen Zellen werden nur α - und β -Defensine exprimiert. Defensine wurden aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Epithelzellen isoliert. Während α -Defensine bei Menschen von den Neutrophilen produziert werden, exprimieren Keratinozyten der menschlichen Haut die β -Defensine hBD-1 bis -4 (40, 41). Bei Verletzungen und Entzündungen der Haut ist die hBD-2 und -3-Expression erhöht. Sie wird induziert durch bakteriellen Kontakt und proinflammatorische Zytokine (42), wobei IL-1 den größten Effekt auf die Steigerung der hBD-2-Ausschüttung, IFN- γ auf die hBD-3-Expression hat (42–44). Die vier β -Defensine sind in verschiedenste zelluläre Aktivitäten involviert, beispielsweise in die Produktion proinflammatorischer Botenstoffe und die Chemotaxis dendritischer Zellen, T-Zellen, Mastzellen und neutrophiler Granulozyten (45).

Histatine sind eine Familie von Histidin-reichen Peptiden, die in humanem Speichel vorkommen (46–48).

Psoriasin (S100A7) ist ebenfalls ein antimikrobielles Peptid. Es gehört zur S100-Genfamilie. Exprimiert wird Psoriasin in Keratinozyten von humaner gesunder Haut, besonders in Hautbereichen mit verstärkter bakterieller Belastung, wie beispielsweise Haarfollikel, Nase, Unterschenkel und Handflächen (49). Während andere AMP, wie hBD-2, hBD-3 und LL-37, nur in entzündeter Haut gefunden werden, kommt Psoriasin auch in gesunder Haut vor. Seine Expression wird im Falle einer Verletzung oder Infektion von proinflammatorischen Zytokinen oder bakteriellen Bestandteilen noch gesteigert. Das von Keratinozyten gebildete AMP wirkt in niedrigen Dosen hauptsächlich gegen *E. coli*, in größeren Mengen jedoch auch gegen andere Keime, wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus aeruginosa* (50). Auch wurde eine chemotaktische Wirkung auf T-Zellen und neutrophile Granulozyten beschrieben (51). Die Sekretion wird unter anderem durch TNF- α , IFN- γ und IL-1 β induziert und kann durch Th2-Zytokine wieder gehemmt werden (50).

1.1.3 AMP in Hauterkrankungen

Die erste Säule antimikrobieller Abwehr ist die physische Barriere des Stratum corneum, das durch die physiologische Mikroflora, antimikrobielle Lipide und antimikrobielle Proteine unterstützt wird. Gerät das dort notwendige Gleichgewicht aus den Fugen, können Hauterkrankungen verschiedener Art und Ausprägung entstehen. Im Folgen-

den wird exemplarisch die Pathogenese von atopischer Dermatitis, Rosazea und Psoriasis, sowie die Rolle von AMP vorgestellt.

Die atopische Dermatitis gehört zu den häufigsten chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen. Sie weist eine genetische Prädisposition zur gesteigerten Empfindlichkeit der Haut gegenüber Umweltfaktoren auf, die meist mit erhöhter IgE-Produktion und Eosinophilie einhergeht. Die Patienten leiden unter typischerweise an den Beugeseiten lokalisierten Ekzemen mit massivem Juckreiz und sehr trockener Haut. Der Verlauf ist wechselhaft und wird durch Umweltfaktoren und endogene Faktoren getriggert (52). Die Betroffenen haben eine gesteigerte Anfälligkeit zu bakteriellen, mykotischen und viralen Infektionen. Diese und die daraus entstehenden Hautentzündungen erschweren die erfolgreiche Therapie der Erkrankung. Die Ursache hierfür ist unter anderem in fehlregulierten T-Zellsubtypen und einem Defizit an AMP zu suchen (53). Während man lange annahm, dass die Patienten mit atopischer Dermatitis eine deutlich reduzierte Produktion in der läsionalen Haut zeigten (54), so haben aktuelle Studien dies in Vergleichen zu gesunder Haut widerlegen können (55). Aus ihnen ging hervor, dass die AMP-Spiegel in läsionaler Haut von atopischer Dermatitis höher sind, als in gesunder Haut. Dennoch findet sich hier eine deutlich geschwächte antimikrobielle Barriere, die in der für diese Krankheit typischen Anfälligkeit für mikrobielle Superinfektionen resultiert (56, 57). Ausdruck der gestörten Barrierefunktion sind folgende typischen Befunde: gesteigerter transepidermaler Wasserverlust ohne verminderte Feuchtigkeit der Hornschicht, erhöhte Permeabilität und Rauigkeit, verminderte Oberflächenlipide, verkleinerte Talgdrüsen und veränderte Ceramidsynthese (58). Die Induzierbarkeit von AMP in der Haut ist bei atopischer Dermatitis vermindert. Eine Ursache dafür ist möglicherweise in dem veränderten Zytokin-Mikromilieu dieser Läsionen zu suchen (56). So könnte ein möglicher Grund für die beobachteten sehr niedrigen hBD-2-Werte in atopischer Dermatitis die Anwesenheit von Zytokinen der Th2-Zellen, wie beispielsweise IL-4 und IL-13, sein. Diese sind bekannt dafür, die TNF- α -gesteuerte Expression von hBD-2 *in vitro* zu hemmen (43, 54). Auch andere AMP werden durch die Verlagerung der Immunprozesse zugunsten der Th2-Zellen beeinflusst. Dieser Umstand trägt in hohem Umfang zur gestörten antimikrobiellen Hautreaktion bei. Die Psoriasin-Ausschüttung ist erstaunlicherweise in atopischer Dermatitis erhöht, vergleichbar mit den in psoriatischen Läsionen ermittelten Werten (50).

Rosazea ist eine Erkrankung, die sich durch überschießende Entzündung und Blutgefäßbildung, hervorgerufen durch Zellaktivierungsmechanismen im Bereich der Gesichtshaut, definiert. Es wurde nachgewiesen, dass Rosazea-Patienten ein Übermaß an Cathelicidin in Form von LL-37 produzieren (59). Außerdem ergaben Untersuchungen, dass sich die gefundenen Cathelicidin-Peptide stark von denen unterscheiden,

die man üblicherweise in der Haut von Gesunden in geringen Mengen findet. Bei Rosazea entdeckte Formen sind das Resultat von abnormalen post-translationalen Prozessierungsvorgängen, verbunden mit einem Anstieg der Proteaseaktivität in der Epidermis (59). Sie rufen kutane Entzündungen und vaskuläre Reaktionen hervor (60).

Auch in psoriatischen Läsionen wurden diverse antimikrobielle Peptide, darunter LL-37, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin (40), in veränderter Konzentration gefunden (siehe 1.2). Doch im Gegensatz zu den bei der atopischen Dermatitis vorherrschenden Th2-Zytokinen (IL-4, IL10 und IL-13), produzieren psoriatische T-Zellen hauptsächlich Zytokine vom Th1-Muster (IFN- γ , IL-2, TNF- α) (58).

1.2 Psoriasis

Psoriasis ist eine genetisch geprägte, chronisch rezidivierende und entzündlich-proliferative Hauterkrankung. Die Vererbung erfolgt weder eindeutig dominant, noch rezessiv. Aus bisherigen Daten ergibt sich das Bild einer polygenetischen, multifaktoriellen Erkrankung, bei der diverse Triggerfaktoren, wie verschiedene Medikamente, klimatische Einflüsse, Infektionen und Stress, zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes führen. Meist beginnt sie im frühen Erwachsenenalter. Das Krankheitsbild ist geprägt von stark vermehrter Zellneubildung. Die DNA-Synthese und die mitotische Aktivität sind in den basalen Abschnitten der Epidermis um ein Vielfaches erhöht (58). So beträgt der epidermale Turnover in gesunder Haut ca. 28 Tage, in Psoriasis-haut jedoch nur drei bis vier Tage (53). Betroffen können, je nach Form und Ausprägung der Krankheit, neben der Haut auch Nägel und Gelenkstrukturen sein. Die Mundschleimhaut ist in der Regel frei von Läsionen.

Klinisch zeigen sich unterschiedliche Formen der Psoriasis: Die Psoriasis vulgaris ist die häufigste Form der Manifestation. Sie verläuft chronisch und weist typische Plaques an den Prädilektionsstellen (behaarter Kopf, Ellenbogen, Knie, umbilikal und perianal) auf. Nach Auswertung der Daten bezüglich Erkrankungsalter und der Assoziation mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA-Antigene) ließen sich zwei Typen der Psoriasis vulgaris definieren: Die Typ-1-Psoriasis mit frühem Beginn (vor dem 40. Lebensjahr), meist schwererem Krankheitsverlauf und erkennbarer familiärer Häufung, sowie die Typ-2-Psoriasis mit spätem Beginn (nach dem 40. Lebensjahr), die eher leichter verläuft und ohne sichtbare familiäre Häufung auftritt (58). Die Erstmanifestation ist häufig die Psoriasis guttata, die auch durch Triggerfaktoren wie Medikamente und Streptokokkeninfektionen ausgelöst werden kann. Sie zeigt sich meist als eine Aussaat kleiner Läsionen. Bei dieser Form der Psoriasis ist die Suche nach Fokalinfekten und deren Behandlung angezeigt, sie kann jedoch auch bei ande-

ren Ausprägungen hilfreich sein. Die Psoriasis arthropathica bezeichnet eine Form, die vorwiegend zusammen mit der Psoriasis vulgaris vom Typ I auftritt. Es werden zwei Typen unterschieden. Beim peripheren Typ sind ein oder mehrere Gelenke von akuten, sehr schmerzhaften und geröteten Auftreibungen betroffen. Der axiale Typ führt zu einer Versteifung der Iliosakralgelenke und der Wirbelsäule. Im Rahmen akuter Psoriasissschübe kann es zu pustulösen Eruptionen kommen, die häufig als gruppiert stehende, bei Berührung schmerzhafte, intraepidermale, weiße Pusteln auf geröteter Haut stehen. Hierbei handelt es sich um eine Psoriasis pustulosa (52). Im folgenden Teil dieser Arbeit ist, soweit nicht näher definiert, mit dem Begriff „Psoriasis“ die Form der Psoriasis vulgaris gemeint.

Das klinische Bild der Psoriasis vulgaris zeigt typische Hautveränderungen, die insgesamt monomorph und erythematosquamös sind. Sie sind rundlich, scharf begrenzt und leicht erhaben. Charakteristisch sind die Kratzphänomene, welche die Diagnostik zusätzlich erleichtern: Das Kerzenwachsphänomen beschreibt das anfangs entfernbare silbrige Schuppenmaterial. Die tieferen Zellschichten lassen sich dann in einem Zug abziehen, was als Phänomen des letzten Häutchens bezeichnet wird. Das Ausspitzphänomen beschreibt die Entstehung winziger Blutpunkte, blutiger Tau genannt, beim Entfernen dieses letzten Häutchens (58). Die Papillenspitzen liegen hier durch die Papillomatose sehr oberflächlich und werden so leicht aufgerissen. Nach der Abheilung psoriatischer Läsionen gehen diese in einen hypopigmentierten Fleck über, das sog. psoriatische Leukoderm, das nach wenigen Wochen repigmentiert (61).

Die Erkrankung ist durch Immunprozesse gekennzeichnet, bei denen T-Zellen durch Auto-Antigene im Sinne einer Autoimmunerkrankung stimuliert werden. Die in hoher Zahl vorkommenden Leukozyten schütten Interleukine aus, die einen entzündungs- und proliferationsfördernden Effekt auf Keratinozyten haben. Diese massive Proliferation der Keratinozyten führt zu zwei typischen Merkmalen in der Histologie der Psoriasis: Akanthose und Parakeratose. Außerdem sind in der Regel deutlich elongierte Reteleisten zu erkennen (52). Bei Psoriasispatienten ist nicht nur die läsionale, sondern die gesamte Haut erkrankt. Morphologisch kann sie winzige psoriatische Veränderungen zeigen. Funktionell besteht die Bereitschaft, auf verschiedene Stimuli mit Psoriasis zu reagieren (61). Das Einströmen aktivierter T-Lymphozyten kann, im Rahmen des Köbner-Phänomens (siehe 1.2.1), beispielsweise durch epidermale Traumen provoziert werden.

1.2.1 Cathelicidin und Psoriasis

Psoriasispatienten leiden signifikant weniger unter bakteriellen und viralen Hautinfektionen. Evolutionstheoretisch betrachtet bot dies in der Entwicklungsgeschichte einen

Selektionsvorteil und führte dadurch zu einer starken Verbreitung der Veranlagung für Psoriasis (52). Möglicherweise hängt diese relative Resistenz gegenüber Hautinfektionen mit der erhöhten Cathelicidin-Expression in läsionaler Haut zusammen (54, 62), obgleich hier wohl eher dessen Wirkung als „Alarmin“ denn als antimikrobieller Wirkstoff im Vordergrund steht (35, 37). LL-37 wirkt außerdem durch Hemmung der Caspase-3-Aktivierung und Hochregulation der Expression antiapoptotischer Gene in Keratinozyten antiapoptotisch (63).

Neue Erkenntnisse und die Tatsache einer Überexpression von LL-37 in Psoriasishaut weisen darauf hin, dass es sich bei der Pathogenese um einen autoimmunen Mechanismus handelt. Dieser beruht auf einer deutlich verringerten Toleranz gegenüber körpereigener DNA (37) (Abbildung 3). LL-37 bindet extrazelluläre DNA-Fragmente und bildet mit ihnen Komplexe. Diese werden von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) aufgenommen. pDCs haben die Fähigkeit, virale und mikrobielle DNA zu erkennen und über einen TLR9-vermittelten Signalweg Interferone zu produzieren. Normalerweise reagieren diese Zellen nicht auf körpereigene Nukleinsäuren. Diese Einschränkung ist bei Psoriasispatienten offenbar nicht vorhanden, sodass hier auch Komplexe aus LL-37 und körpereigenen DNA-Fragmenten gebildet werden. Das Eindringen der LL-37-DNA-Komplexe triggert eine TLR9-vermittelte IFN- α -Antwort. IFN- α und - β triggern daraufhin eine lokale Reifung von myeloiden dendritischen Zellen, um autoreaktive Th1- und Th17-Zellen zu aktivieren. Dies führt zu einer erhöhten Produktion von IFN- γ , IL-17 und IL-22 und infolgedessen ebenfalls zur vermehrten Ausschüttung von LL-37 (4, 37). Zusätzlich findet eine abnormale Differenzierung in epidermalen Keratinozyten statt. Die gesteigerte Menge an IL-17 veranlasst außerdem weitere Ansammlungen neutrophiler Granulozyten, die durch ihre Bildung und Spaltung von hCAP18 ihrerseits zu diesem Kreislauf beitragen (64). Durch verhältnismäßig große Mengen weiterer, auch in den Schuppen von Psoriasispatienten nachweisbarer, chemotaktischer Proteine, wie IL-8, wird die transepidermale Migration dieser Neutrophilen zusätzlich verstärkt. Sie bilden im subkornealen Raum Ansammlungen in Form von Mikroabszessen (58). Die entzündlichen Hautläsionen sind auch eine Folgeerscheinung der T-Zell-Ansammlungen in der Haut. In Tierversuchen wurde bereits gezeigt, dass lokal vorhandene T-Zell-Ansammlungen notwendig, aber auch ausreichend sind, um psoriatische Läsionen zu bilden (65).

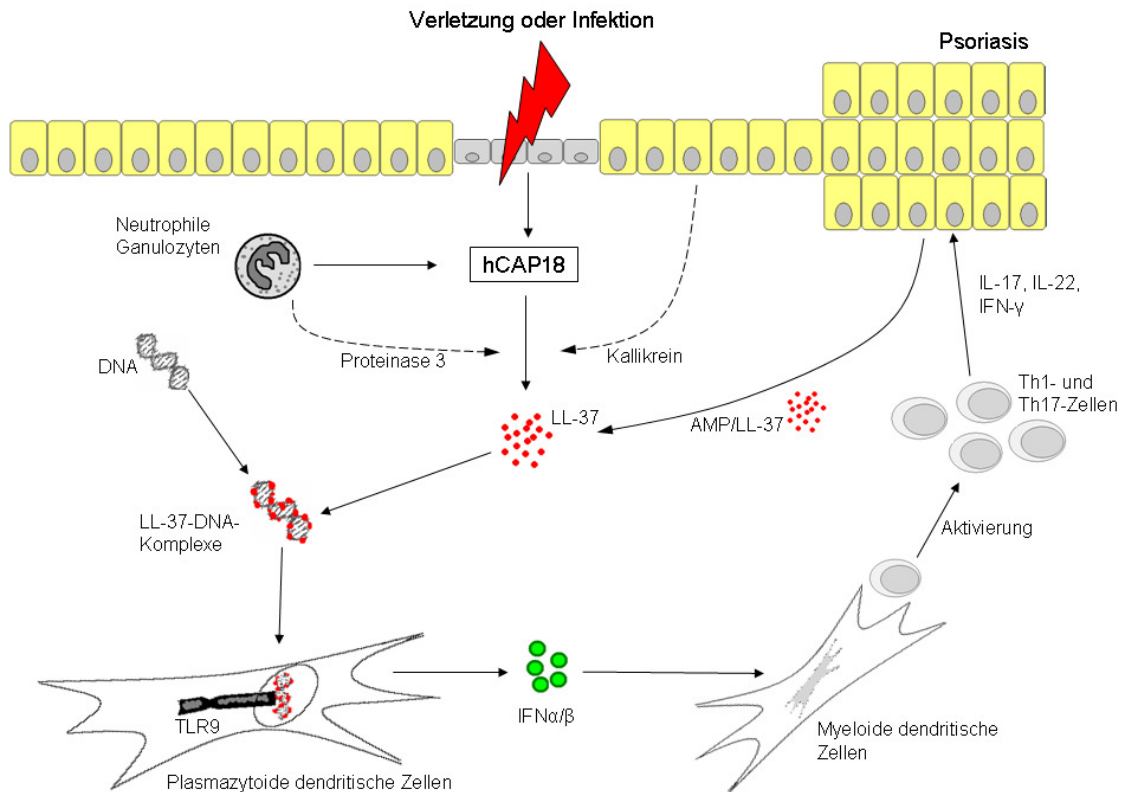


Abbildung 3: Darstellung des Beginns und der Aufrechterhaltung der durch LL-37 entfachten autoimmunen Entzündungsreaktion in der Haut von Psoriasispatienten. Nach Verletzung oder Infektion der Haut werden von Keratinozyten und neutrophilen Granulozyten große Mengen des Cathelicidin-Vorläuferproteins hCAP18 ausgeschüttet, welches wie unter 1.1.1 beschrieben durch Proteinase 3 und Kallikrein zum reifen Peptid LL-37 gespalten wird. Mit körpereigenen, von den beschädigten Zellen abgegebenen DNA-Fragmenten verbindet es sich zu Komplexen, die in plasmazytoiden dendritischen Zellen TLR9 triggern und damit für eine gesteigerte Produktion von Typ1-Interferonen sorgen. Diese triggern die lokale Reifung der myeloiden dendritischen Zellen, die wiederum Th1- und Th17-Zellen aktivieren. Die resultierende Ausschüttung von IL-17, IL-22 und IFN- γ sorgt schließlich für die weitere LL-37-Produktion durch die läSIONALen Keratinozyten, was zur Aufrechterhaltung der psoriatischen Läsion führt (adaptiert nach (4)).

In Bereichen bakterieller Hautinfektionen ist die Cathelicidin-Expression nachweislich erhöht und wird induziert durch ein Durchdringen der Hautbarriere, also bei invasiven Bakterieninfektionen oder physischer Verletzung der Haut (66). Bei Patienten mit klinisch manifester Psoriasis führt eine Reizung der Haut, beispielsweise durch eine solche Wundsetzung, bekanntermaßen zur Induktion psoriatischer Veränderungen. Das sog. Köbner-Phänomen beschreibt diesen auslösbaren Reizeffekt: Dies weist ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen Psoriasis und LL-37 hin. So wird in diesen Bereichen der Haut vermehrt LL-37 ausgeschüttet und kann mit der von toten bzw. absterbenden Zellen des verletzten Areals abgegebenen DNA oben beschriebene Komplexe bilden. Verletzungen sind also ein Triggerfaktor für die Aktivierung der pDC. Eine Blo-

ckierung der Cathelicidin-Produktion in der Psoriasis könnte dagegen zum Durchbrechen des Circulus vitiosus aus erhöhter LL-37-Expression, pDC-Aktivierung und kutaner Entzündung führen.

Auch Makrophagen sind möglicherweise an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt: Eine mögliche Erklärung für den klinisch offensichtlichen Zusammenhang zwischen Psoriasis und Streptokokkeninfektionen der Tonsillen ergaben die Beobachtungen von Makrophagen in der Haut, die Peptidoglykan, ein Zellwandbestandteil grampositiver Bakterien, enthielten. Man vermutet, dass diese nach einer durchgemachten Infektion von den Tonsillen in die Haut gelangen und dort eine Immunreaktion vom Th1-Typ triggern (67, 68).

1.2.2 Therapie der Psoriasis

Die klassische Psoriasistherapie beruht auf drei Säulen: Lokalthherapie, Phototherapie und systemische Therapie. Ziel dieser therapeutischen Möglichkeiten und deren Kombinationen ist zum einen die Entzündungshemmung und zum anderen die Drosselung der überschießenden Keratinozytenproliferation (52). Die Therapieansätze sind dementsprechend antiproliferativ, antientzündlich und/oder immunsuppressiv. Ziele dieser Therapievarianten können dabei das adaptive Immunsystem (z.B. Kortikosteroide, UVB, PUVA), die Keratinozyten (z.B. Vitamin D3, Retinoide, Dithranol), andere Zelltypen (z.B. Methotrexat) oder Kombinationen daraus sein (69). Nach der Keratolyse, die notwendig ist um die eigentlich entzündete Haut behandeln zu können, kann eine Lokalthherapie mit diversen, in Auszügen in Tab.1 dargestellten Therapeutika durchgeführt werden.

Wirkstoff (Handelsnamen)	Wirkmechanismus	Anmerkung
Salicylsäure Harnstoff	Keratinolyse	Anwendung in 5 - 10%iger Konzentration (z.B. in Vaseline), um Hautreizungen zu vermeiden
Calcipotriol (Vitamin D3-Analogon)	antiproliferative und keratinozytendifferenzierungsfördernde Wirkung, anti-entzündliche Effekte	Anwendung an maximal 30% der Körperoberfläche täglich, um eine zu hohe systemische Resorption zu verhindern
Dithranol (Anthra- lin, Cignolin)	antientzündliche Effekte, Hemmung der Keratinozyten-Hyperproliferation durch Apoptose-Induktion	schwierige Handhabung wegen Verfärbung der Kleidung
Teerpräparate	antientzündlich	schwierige Handhabung wegen strengen Geruchs und Verfärbung der Kleidung
lokale Retinoide (Vitamin A-Analoga, z.B. Tazaroten)	antiproliferativ	Gefahr der Reizung der Haut
lokale Steroide	wirksame Drosselung der überschießenden Keratinozytenproliferation, stark antientzündliche Effekte	wegen der Gefahr der Epidermisatrophie und einer Rarefizierung des dermalen Bindegewebes ist eine langfristige Anwendung kontraindiziert; Gefahr des Rebound-Phänomens

Tabelle 1: Beispiele lokaler Therapeutika der Psoriasisstherapie, deren Wirkmechanismen, sowie mögliche, mit deren Anwendung verbundene Probleme (nach (52)).

Die Therapie mit Vitamin D3 und dessen Analoga, zum Beispiel Calcipotriol, hat eine immunmodulatorische Wirkung auf T-Lymphozyten und dendritische Zellen. Außerdem zielt sie darauf ab, die Proliferation verschiedener Zelltypen, inklusive epidermaler Basalzellen, zu hemmen und die epidermale terminale Differenzierung zu normalisieren. Vitamin D-Analoga sind bereits in sehr niedriger Konzentration (0,005% Calcipotriol) topisch wirksam und binden am Vitamin D-Rezeptor fast aller Zellen (58). Vitamin D3-Präparate sollten wegen der Gefahr der perkutanen Resorption und der entsprechenden systemischen Wirkungen (siehe 1.3 und 1.4) nicht zu großzügig eingesetzt werden. Wegen des Risikos einer Hypercalcämie gilt in Lehrbüchern die Grenze 100g Salbe pro Woche (61).

Bei unzureichendem Erfolg der Lokalthherapie kann diese mit einer Ultraviolett-Phototherapie ergänzt werden. Je nach Schweregrad der Erkrankung wird hierfür UVB mit der kleineren oder UVA mit der größeren Eindringtiefe verwendet. Im ersten Fall sind die günstigsten Effekte bei einer Schmalband-UVB-Therapie mit einer Hauptemis-

sion bei 311nm, der sog. Psoriasis-Wellenlänge, zu erwarten (61). Der häufig zu beobachtende Erfolg der UVB-Therapie ist unter anderem auf die Aktivierung der kutanen Vitamin D-Synthese zurückzuführen (70). Die UVA-Therapie kann zusätzlich mit dem Wirkungsverstärker Psoralen zur sogenannten PUVA erweitert werden. Hierbei verbindet sich das photosensibilisierende Psoralen unter der Einwirkung von UVA-Licht mit einer Wellenlänge von 320-400nm mit der DNA der Epidermalzellen. Es entstehen Photoaddukte mit Quervernetzung des Doppelstrangs. Dadurch wird zum einen eine Zellteilung verhindert, zum anderen bewirkt diese PUVA-Therapie die Entleerung der Haut von T-Zellen (61). Die systemische Therapie wird eingesetzt, wenn Lokal- und eventuelle zusätzlich angewandte Phototherapie nicht die erwünschten Erfolge brachten. Hierbei wird beispielsweise das orale Retinoid Acitretin verwendet. Fumarsäure wird aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung eingesetzt, hat aber meist ausgeprägte Nebenwirkungen. In sehr schweren Fällen kann auch die systemische Behandlung mit Immunsuppressiva wie Methotrexat und Ciclosporin A in Erwägung gezogen werden (52).

1.3 1,25 Vitamin D3

1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (1,25D3) gehört zu den Steroidhormonen und wird in den Nieren aktiviert. Die Bezeichnung „Vitamin“ D stammt aus der Zeit, in der man annahm, es sei eine Zufuhr von Calcitriol über die Nahrung erforderlich. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass der menschliche Körper in der Lage ist, ausreichende Mengen Vitamin D3 zu bilden, vorausgesetzt, es ist genügend Provitamin D3 vorhanden und es kommt für kurze Zeit zur Exposition mit UVB-Licht (71, 72). Man nimmt an, dass zwischen 80% und 100% der vom Menschen benötigten Menge an Vitamin D durch die Bestrahlung mit Sonnenlicht produziert werden. An einem sonnigen Sommertag sollen bei Sonnenlichtexposition des gesamten Körpers in etwa 10000IU Vitamin D produziert werden (73). Das entspricht einer Menge von 250µg. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über die Galle.

Vitamin D3 spielt eine Schlüsselrolle bei der Calcium-Homöostase und im Knochenstoffwechsel, indem es die Ca^{2+} -Absorption und -Resorption in Darm und Nieren, sowie den Ca^{2+} -Umsatz der Knochen stimuliert (74, 75). In diesem Rahmen wird die 1,25D3-Produktion durch einen Mangel an Calcium und Phosphat, sowie durch das Parathormon erhöht. Durch negatives Feedback, also durch zu viel frei zirkulierendes Calcium und Phosphat und durch 1,25D3 selbst, wird die Aktivierung des Prohormons wiederum gehemmt. Mangelerscheinungen zeigen sich bei Kindern in Form von Rachitis, bei

Erwachsenen als Osteomalazie, da dann der Spiegel des im Blut zirkulierenden Parathormons ansteigt und zum Knochenabbau führt.

An der Produktion und Aktivierung von 1,25D₃ sind verschiedene Zelltypen beteiligt (Abbildung 4). Der Ausgangsstoff hierfür ist Cholesterol. In den Leberzellen wird daraus mit Hilfe der Cholesterol-Dehydrogenase 7-Dehydrocholesterol. Die Synthese von Provitamin D₃ aus 7-Dehydrocholesterol findet in der Haut statt und benötigt UVB-Strahlung, die durch die Epidermis dringt. Die größte Effektivität bei der Absorption ultravioletten Lichts durch 7-Dehydrocholesterol liegt bei einer Wellenlänge von 270-290nm (60). Das Produkt dieser Umwandlung ist Cholecalciferol (auch Calcidiol genannt), das inaktive, nicht hydroxylierte Provitamin D₃. Um die aktive Form zu erhalten, muss Cholecalciferol zweimal hydroxyliert werden: Nach der ersten Reaktion, einer Hydroxylierung an C²⁵, entsteht 25-Hydroxy-Cholecalciferol (synonym: 25D₃, Calcidiol). Dieser Schritt findet mit Hilfe des Enzyms Vitamin D-25-Hydroxylase (CYP27A1) statt. Die zweite Hydroxylierung erfolgt an C¹ und erzeugt die aktive Form, das 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (synonym: 1,25D₃, Calcitriol). Hierfür wird die 1- α -Hydroxylase (CYP27B1) benötigt. Sie konkurriert mit der katabolisch wirkenden 24-Hydroxylase (CYP24A1), welche das Prohormon inaktiviert, um das 25(OH)D₃. Beide Enzyme sind gegenläufig reguliert. CYP27A1 und CYP27B1 wurden in der Leber und den Nieren nachgewiesen (76). Auch in Keratinozyten finden sich diese Enzyme, so dass sie selbst, unabhängig von Leber und Nieren, zur Herstellung aktiven Calcitriols in der Lage sind (77). Dies ist sehr wichtig für eine gesunde Haut, da die Anwesenheit von 1,25D₃ entscheidend zur Entwicklung und Proliferation normaler Keratinozyten, sowie der Aufrechterhaltung einer intakten epidermalen Barriere notwendig ist (60, 78). Kontrolliert werden diese Enzyme durch den Toll-like-Rezeptor 2. Im Falle einer Verletzung oder Infektion der Haut wird dieser und sein Cofaktor CD14 verstärkt exprimiert und aktiviert. Das veranlasst die Expression von CYP27B1, welches dann die Umwandlung der lokal gespeicherten Pools von 25D₃ zu 1,25D₃ durchführt (79). In diesen Hautbereichen, also nach entsprechenden inflammatorischen Stimuli kommt es zu einem lokalen Anstieg der CYP27B1-Expression und damit auch zu höheren Werten aktiven Vitamin Ds (60, 79, 80). Doch auch CYP24A1 wird in diesen Bereichen verstärkt produziert (79). Die gleichen Reaktionen, also ein Anstieg der Produktion von TLR2, CD14 und die daraus resultierende verstärkte AMP-Expression, finden bei topischer Behandlung der Haut mit 1,25D₃ statt.

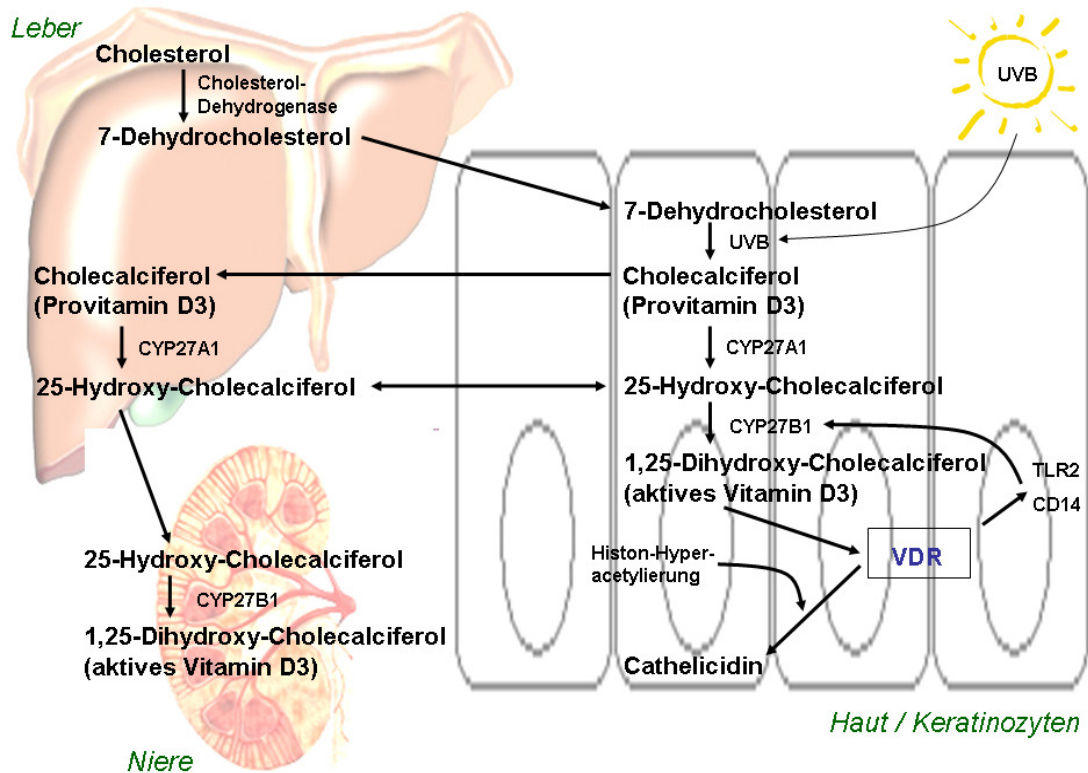


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vitamin D₃-Synthese in den entsprechend beteiligten Organsystemen.

Die meisten biologischen Effekte von Vitamin D werden durch den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Dieser gehört zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren (81). Nachdem 1,25D₃ an den Rezeptor gebunden hat, bildet dieser einen Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) (82). Der so entstandene Komplex bindet an Vitamin D-responsive Elemente (VDRE) innerhalb der Promoter-Region der auf 1,25D₃ reagierenden Gene. Anschließend kommt eine Vielzahl an nukleären Coaktivator-Proteinen zum Einsatz, die beispielsweise über intrinsische Histon-modifizierende Aktivitäten den Umbau des Chromatins einleiten. Außerdem induzieren sie die Rekrutierung von Schlüsselkomponenten für den Transkriptions-Start-Komplex am regulierten Promoter (78, 83). So können Veränderungen der Ladung der Nukleosome zum Verlust intra- oder internukleosomaler Interaktionen zwischen DNA und Histonen führen. Eine gesteigerte Histon-Acetylierung an der Promoter-Region ermöglicht dann die aktivere Transkription (84). Kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat und Trichostatin A können die Azetylierung des Histon H4 durch Hemmung der Histon-Deacetylase steigern. Damit induzieren bzw. unterdrücken sie die Genexpression unterschiedlicher Zellen, wie auch die der Keratinozyten (85). So wirken diese Deacetylase-Hemmer ebenso modulierend auf die Genexpression wie Zytokine und Wachstumsfaktoren (28).

Der VDR wird im Wesentlichen von antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, produziert. Er kann auch, nach einer Aktivierung, von Lym-

phozyten gebildet werden. Dies legte den Schluss nahe, dass 1,25D₃ auch im Immunsystem eine Rolle spielt (86). Das sogenannte adaptive Immunsystem sorgt für spezifischere Reaktionen, benötigt dafür aber längere Zeit. Die angeborene Immunantwort erfolgt schneller, aber entsprechend weniger spezifisch. Vitamin D₃ reguliert sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem. Es hemmt die erworbene und potenziert die schnelle, angeborene Immunität (87). Das für den finalen Hydroxylierungsschritt im Rahmen der 1,25D₃-Synthese verantwortliche Enzym 1- α -Hydroxylase wird auch von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (88). Während die renale 1- α -Hydroxylase hauptsächlich durch Mediatoren der Calcium- und Knochen-Homöostase, wie das Parathormon und 1,25D₃ selbst, reguliert wird, ist seine Makrophagen-Form hauptsächlich unter der Kontrolle von Immunsignalen wie IFN- γ . Gleiches gilt auch für die Bildung durch dendritische Zellen und Keratinozyten (77, 89). Ein negatives Feedback durch 1,25D₃ selbst kann in aktivierten bzw. differenzierten Makrophagen, dendritischen Zellen und Keratinozyten nicht beobachtet werden (88, 90). Das erklärt die entstehende Hypercalcämie bei Makrophagen-Überaktivierung. Die Hochregulation der CYP27B1-Bildung in dendritischen Zellen hängt mit deren p38 MAPK- und NF- κ B-abhängigen Reifung zusammen und ist ebenfalls resistent gegen eine negative Rückkopplung (83).

Es wurde nachgewiesen, dass 1,25D₃ die Differenzierung von Monozyten zu humanen dendritischen Zellen, sowie deren Reifung zu antigenpräsentierenden Zellen hemmt (83, 91). Außerdem wird die Apoptose dendritischer Zellen gefördert (83). Darüber hinaus konnten direkte Effekte von 1,25D₃ auf T-Lymphozyten nachgewiesen werden (83). *In vitro* hat sich gezeigt, dass durch Zugabe von 1,25D₃ die T-Zell-Proliferation, die Zytokin-Ausschüttung und der Verlauf der Zellzyklen gehemmt wird (60). Es senkt die Produktion von IFN- γ und IL-2 in T-Zellen, erhöht aber die von IL-4 (83, 92). Das immunstimulierende IL-12 wird eindeutig durch 1,25D₃ in dendritischen und anderen antigenpräsentierenden Zellen gehemmt (93). Es ist das entscheidende Zytokin bei der Frage, in welcher Richtung das Immunsystem aktiviert wird. Durch diese Hemmung greift 1,25D₃ direkt in die Kaskade der Immunreaktionen ein und führt damit zum Umschalten von einem Th1- auf ein Th2-Reaktionsprofil (60). Zusätzlich wird die Ausschüttung des immunsuppressiven IL-10 durch dendritische Zellen, welches den Th1-orientierten Effekten von IL-12 entgegen wirkt, verstärkt (94, 95).

1,25D₃ hat bei Vorgängen der Immunabwehr auch die Funktion eines Signalmoleküls, unter anderem indem es die Cathelicidinexpression steigert. Ein VDRE im Cathelicidin-Promoter lässt darauf schließen, dass Cathelicidin ein direktes Ziel in Keratinozyten darstellt (28, 31, 32). Seltsamerweise werden seit langer Zeit Vitamin D und seine Analoga in der Psoriasisstherapie verwendet, obwohl diese nachgewiesenermaßen den

VDR aktivieren, damit die Cathelicidinmenge in Keratinozyten erhöhen und demzufolge die Entzündung der Haut noch verschlimmern müssten. Dennoch kann man das Gegenteil beobachten: Nach Lokalthherapie mit Vitamin D oder dessen Analoga kommt es meist zur Besserung der Beschwerden, sowie zum Abklingen der Entzündung und zur Rückbildung der morphologischen Veränderungen innerhalb der Hautläsionen (96).

Vitamin D3 hat antiproliferative, immunsuppressive und immunmodulatorische Effekte (86, 97, 98). Die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten haben allerdings Einschränkungen bezüglich der Dosis. Durch die hypercalcämischen Nebenwirkungen bestehen die Gefahren von Hypercalcämie, Hypercalcurie, renaler Calcifizierung und erhöhter Knochenresorption, wenn es in hohen Dosen verabreicht wird (99, 100). Daher ist es von großer Wichtigkeit, neue Vitamin D-Analoga zu finden, die die therapeutische Wirksamkeit mit Vitamin D teilen, dabei aber minimale calcämische Aktivität aufweisen. Hierbei ist die Hypercalcurie, im Vergleich zur Hypercalcämie, als empfindlicherer Parameter anzusehen, da letztere erst dann auftritt, wenn die verstärkte Knochencalcifizierung und die Calcium-Ausscheidung durch die Nieren nicht mehr suffizient sind.

1.4 Vitamin D3-Analoga

Das Haupttransportmolekül für Vitamin D3-Derivate ist das Vitamin D-bindende Protein (VDBP). Es regelt die Verfügbarkeit und Gewebezugänglichkeit der Derivate. Einige Studien zeigten, dass eine chemische Modifikation an der Seitenkette der Analoga zu einer geringeren Affinität am VDBP führt und daher *in vivo* mit weniger Effekten auf den Calcium-Haushalt verbunden ist (101, 102). In dieser Arbeit wurden die Aktivitäten vier ausgewählter Vitamin D3-Analoga untersucht und ausgewertet: Die Agonisten Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und der partielle Antagonist ZK159222 (Abbildung 5).

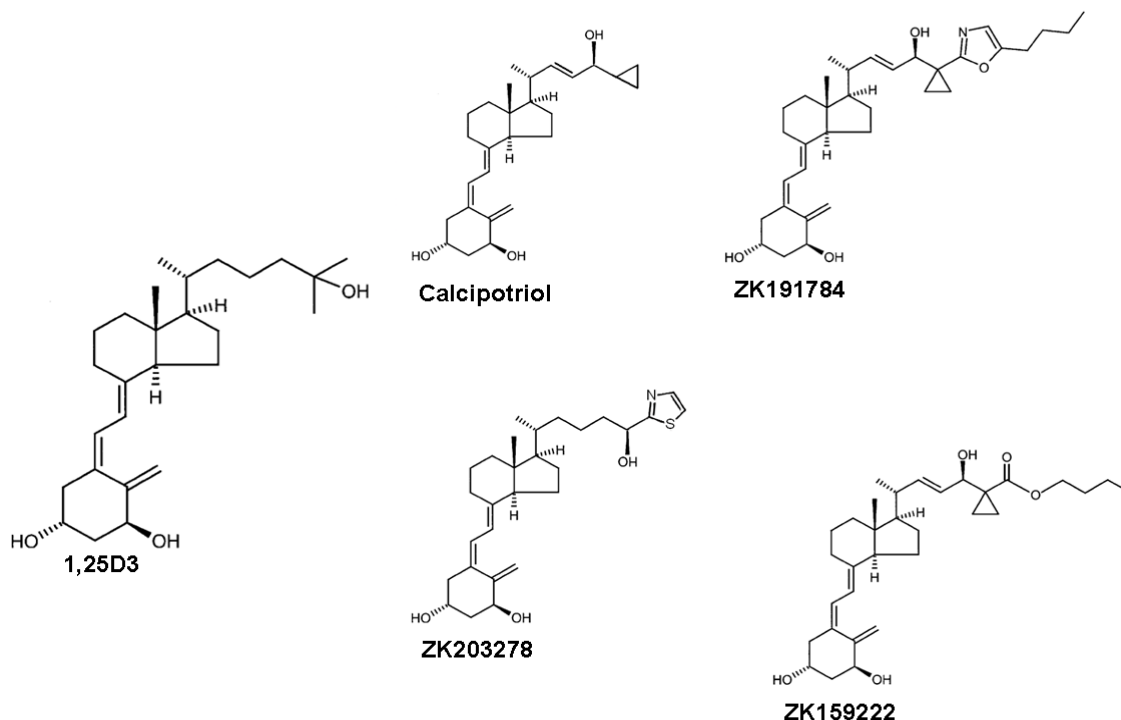


Abbildung 5: Struktur von 1,25D₃ und seinen Analoga Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222. Die Unterschiede im Bereich der Seitenkette schlagen sich entsprechend in der Wirkung nieder.

Die Wirkungsweise von Vitamin D₃-Derivaten als Liganden des VDR ergibt sich durch die Modulation der Transkription von Genen mit VDRE in ihrer Promoterregion (siehe 1.3). Sie bewirken die Hemmung verschiedener Aspekte kutaner Entzündung und epidermaler Proliferation und sorgen so für die Entwicklung einer normalen Keratinisierung.

Ein in der Psoriasisbehandlung seit vielen Jahren häufig verwendetes 1,25D₃-Analogon mit einer solchen Seitenketten-Modifizierung ist Calcipotriol. Es hemmt die Zellproliferation und fördert die Zelldifferenzierung (103). Wird es in Kombination mit Phototherapie, Cyclosporin oder Retinoiden verabreicht, können noch bessere Wirkungen in der Therapie erzielt werden und die kumulativen Effekte ermöglichen eine Dosisreduktion in der Behandlung. Die Halbwertszeit von Calcipotriol ist sehr viel kürzer als die von 1,25D₃. Die Metaboliten sind inaktiv (104).

Bourke et al. untersuchten 10 Patienten mit ausgeprägter Psoriasis, die 100g Calcipotriol pro Woche über einen Zeitraum von vier Wochen verwendeten. Die mittlere Calcium-Konzentration des Urins stieg wenig aber signifikant, von 4,75mmol/24h auf 5,89mmol/24h. Die Normalwerte liegen zwischen 2,5mmol/24h und 7,5mmol/24h. Die Serum-Calcium-Konzentration blieb unverändert. Auch nachdem 10 weitere Patienten mit erheblichen Psoriasisläsionen mit 200g Calcipotriol für eine Woche und mit 300g über eine zweite Woche hinweg therapiert wurden, bildete keiner von ihnen eine Hypercalcämie aus. Sowohl die mittleren Serumkonzentrationen, als auch die Urinkon-

zentrationen stiegen zwar an, bewegten sich jedoch noch immer innerhalb der Normwertgrenzen und sanken innerhalb von zwei Wochen nach Absetzen der Therapie wieder auf ihre Ausgangswerte zurück (105). Die Kontraindikationen einer Calciprotiol-Therapie beinhalten zwar Hypercalcämie, Schwangerschaft und Stillzeit, bei Verabreichung der empfohlenen Dosen bestehen jedoch in der Regel als alleinige Nebenwirkung Hautreaktionen in Form von läsionalen und periläsionalen Irritationen bei ca. einem Fünftel der Patienten (104).

Das Vitamin D₃-Analogon ZK191784 wurde in dem Bestreben entwickelt, immunmodulatorische und hypercalcämische Aktivitäten von 1,25D₃ von einander zu trennen. Es bindet mit ca. 33% der Affinität von Vitamin D₃ selbst an den VDR. ZK191784 hemmt ebenfalls die Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation und Zytokin-Sekretion *in vitro*, sowie die TNF- α -Produktion von Monozyten, die einen wichtigen Teil proinflammatorischer Zytokine darstellt. Auch die fördernden Effekte auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist beiden Substanzen gemeinsam, was ein bedeutender Aspekt der unspezifischen Immunabwehr ist. Zügel et al. wiesen nach, dass gleichzeitig vorhandenes ZK191784 und 1,25D₃ um den vorhandenen VDR konkurrieren (97). Die Ca²⁺-Aufnahme wird dagegen nicht stimuliert. *In vivo*- und *in vitro*-Experimente lassen sogar darauf schließen, dass ZK191784 als Antagonist von 1,25D₃ im Darm und als partieller Antagonist in der Niere wirkt (106). Eine Affinität gegenüber Vitamin D-bindenden Proteinen im Serum ist nicht vorhanden (97). In Versuchen mit einem Mausmodell wurde die durch 1,25D₃ hervorgerufene Überexpression von intestinalen Ca²⁺-Transporterproteinen durch ZK191784 wieder gesenkt (106). Weitere Studien an murinen Modellen ergaben eine signifikante Erhöhung der Calcium-Werte im Urin bei topischer Behandlung mit 0,1 μ g/kg Körpergewicht 1,25D₃ am Tag. Ein zwar signifikanter, aber dennoch geringerer Anstieg trat bei Verwendung von ZK191784 erst bei einer Dosis von 300 μ g/kg Körpergewicht je Tag auf (97). Dem entsprechend sind bei diesem Analogon kaum hypercalcämische Nebenwirkungen zu erwarten, dafür aber ein sinnvolles therapeutisches Fenster.

ZK203278 zeigt eine potente immunmodulatorische Aktivität *in vitro* und *in vivo*, sowie ein dissoziiertes Profil, was diese und die calcämische Wirkung betrifft. Es hemmt Lymphozytenproliferation *in vitro* mit der gleichen Stärke und Wirksamkeit wie 1,25D₃ selbst. Auch die Ausschüttung von entzündungstypischen Zytokinen wie TNF- α und IL-12 wird in niedriger Dosierung *in vitro* gehemmt. Die Produktion von Zelloberflächenmolekülen in Monozyten, die in die Zelladhäsion und die Antigenpräsentation involviert sind, wird durch ZK203278 in niedriger nanomolarer Konzentration herunterreguliert. Der Hauptunterschied zwischen 1,25D₃ selbst und diesem Analogon liegt in der calcämischen Aktivität. Während 1,25D₃ in therapeutischer Dosierung mit einem Anstieg

der Calcium-Ausschüttung einhergeht, entfaltet ZK203278 seine volle Wirksamkeit in Dosen, die keine Hypercalcurie erzeugen. Unter Testbedingungen zeigten sich die ersten Anzeichen einer solchen Nebenwirkung bei 60µg/kg Körpergewicht/Tag. Im Maus-Modell ergab sich ein beachtliches therapeutisches Fenster. Das Präparat wurde in nicht-hypercalcämischer Dosierung sehr gut vertragen. Auch im Ratten-Modell konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Hier traten erhöhte Serum-Calcium-Werte bei Dosierungen im Bereich von 100µg/kg KG/Tag auf, während sich gleiche Anstiege bei Behandlung mit 1,25D3 bereits bei Dosen von weniger als 0,1-0,2µg/kg KG/Tag ergaben. Die Grenze zur Hypercalcurie lag in Nagetiermodellen bei mehr als 10µg/kg KG/Tag, während signifikante therapeutische Effekte bereits mit Dosen von 0,1µg/kg KG/Tag erreicht wurden. Das zeigt deutlich, wie günstig das therapeutische Fenster liegt. Die Affinität zum VDBP ist in etwa 1000-fach geringer als die von 1,25D3 selbst, was neben der calcämischen Aktivität sowohl die Clearance-Rate, als auch die Halbwertszeit des Derivats *in vivo* beeinflusst (97).

Zellen, die mit 1,25D3-Antagonisten, wie ZK159222, behandelt werden, enthalten auch, wie bei Stimulation mit Agonisten, VDR-RXR-Heterodimere (siehe 1.3), aber in einer anderen Konformation als bei Stimulation mit einem Agonisten (107). Sie zeigen keine Interaktionen mit Coaktivator-Proteinen (108). Die Stärke des Antagonismus scheint von der Rate der VDR-RXR-Expression abzuhängen, wobei hohe RXR-Levels den antagonistischen Effekt reduzieren (107). Das Vermögen, die VDR-RXR-Bildung an einem VDRE zu fördern, ist bei dem Antagonisten ZK159222 ca. 7-fach geringer als bei 1,25D3 selbst (108). Die Stabilisierung dieser Komplexe am VDRE erfolgt jedoch in nahezu gleicher Stärke wie unter dem Einfluss von Vitamin D3 selbst (109). Bei Co-stimulation von 1,25D3 und ZK159222 in hundertfach höherer Konzentration zeigen sich deutliche antagonistische Effekte *in vitro* und *in vivo*. Die Mehrzahl der VDR-Moleküle ist dann durch den Antagonisten besetzt. Das Resultat dieser Vorgänge sind die zu beobachtenden reduzierten Interaktionen mit Coaktivatoren und die daraus folgende Reduktion Liganden-induzierter Reporteraktivität (108).

1.5 Ziel der vorliegenden Untersuchung

Psoriasis ist eine weit verbreitete Hauterkrankung, deren Bild von massiver Entzündung und epithelialer Hyperproliferation geprägt ist. In psoriatischen Läsionen konnte ein Überschuss an Cathelicidin in Form von LL-37 nachgewiesen werden. Zur Therapie wurde häufig Vitamin D3 und dessen Induktion durch UV-Bestrahlung genutzt. Da dieser Wirkstoff jedoch starke Nebenwirkungen auf den Calcium- und Phosphathaushalt hat, wurden Analoga entwickelt, die über eine differenziertere Wirkungsweise verfügen.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier dieser Analoga untersucht und überprüft, inwieweit sie Einfluss auf die Expression antimikrobieller Peptide, speziell hCAP18/LL-37, haben. Weiterhin wurden die beteiligten Signalwege beleuchtet, um eine paradoxe Beobachtung zu erklären: Eine Steigerung der LL-37-Expression durch Behandlung mit den Analoga führt zu einer Besserung der, mit LL-37-Überexpression verbundenen, Psoriasisläsionen, obwohl für LL-37 proinflammatorische Wirkungen beschrieben wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hautproben von Patienten

Die Probenentnahme aller Hautbiopsien von Patienten und gesunden Probanden wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Die Einverständniserklärung aller Probanden liegt vor. Die Patienten wurden vor der Teilnahme an dieser Studie noch keiner topischen Therapie unterzogen. Bei den Proben handelt es sich um 4mm-Stanzbiopsien von psoriatischen Plaques vor und 5 bis 7 Tage nach der Behandlung mit calcipotriolhaltiger Salbe (Diavonex®-Salbe; 0,005%, zweimal täglich) (n=8). Zusätzlich wurden Hautbiopsien von gesunden freiwilligen Probanden (n=7) als Kontrollreferenzen benutzt. Die Aufnahme aller Proben erfolgte direkt nach Entnahme in 1ml Trizol® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder geschnitten jeweils zur Hälfte in 1ml Trizol® bzw. 200µl RIPA–Buffer (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 1% Triton-X100, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 140mM NaCl, 1mM PMSF). Nach Homogenisierung aller Proben wurde die mRNA-Extraktion oder die Proteinisolierung durchgeführt und analysiert, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.4.1 genauer beschrieben.

2.1.2 Zellen und Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Herasafe, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die Lagerung sämtlicher Lösungen erfolgte bei 4°C, der Gebrauch jedoch meist bei Raumtemperatur. Für diese Arbeit wurden primäre humane epidermale Keratinozyten (NHEK) (Cascade Biologics, Karlsruhe, Deutschland) und HaCaT-Keratinozyten (Human adult low Calcium high Temperature) (ATCC, Wesel, Germany) benutzt. NHEK wurden in EpiLife® Zellkulturmedium mit 0,06mM oder 1,7mM Calcium und 1xEpiLife® defined growth supplement (EDGS, Cascade Biologics) unter Standardbedingungen kultiviert. 10µg/ml Gentamycin und 0,25µg/ml Amphotericin B wurden ebenfalls zugesetzt. Die Ausgangskulturen konnten bis zu fünf Mal passagiert werden.

HaCaT–Keratinozyten wurden in Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) kultiviert, dem 4,5g/l Glucose, 10% fötales Kälberserum (FBS), 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin zugesetzt war. Alle Zelllinien

wurden in 75cm²-Flaschen, 6-, 12- oder 24-Lochplatten bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die jeweils verwendeten Kulturgefäße mussten vor der Überführung von NHEK mit einer Coating-Matrix (Cascade Biologics) beschichtet werden. Das alte Medium der 75cm²-Zellkulturflasche wurde abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden 2ml 1xTrypsin EDTA (Cascade Biologics) hinzupipettiert und im Brutschrank 4–6min gelöst. Die Kontrolle der Ablösung erfolgte mittels Mikroskop. Zur Neutralisierung wurden 2ml Trypsininhibitor (Cascade Biologics) und EpiLife[®] mit Zusätzen zugegeben. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50ml Falcon wurde diese 10min mit einer Geschwindigkeit von 900U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in 10ml EpiLife[®] mit Zusätzen resuspendiert. Je nach Bedarf und geplanter Stimulationszeit wurden nun 150–400µl Zellsuspension je Well auf die beschichteten und mit frischem EpiLife[®] gefüllten Platten übertragen. Ein Aliquot der restlichen Zellsuspension wurde zur Inkubation einer neuen Passage in eine ebenfalls beschichtete und mit frischem EpiLife[®] gefüllte T-75 Zellkulturflasche übertragen.

Das Passagieren der HaCaT-Keratinocyten erfolgte ähnlich mit Ausnahme weniger Arbeitsschritte: Für diese Zellen war kein Beschichten der Platten und Flaschen notwendig. Das Ablösen der Zellen durch Trypsinlösung 0,05% (PAA Laboratories) erforderte eine etwas längere Inkubationszeit (7-10min). Zum Passagieren wurde wie zur Kultivierung das oben beschriebene DMEM verwendet.

2.2 Analysemethoden

2.2.1 Analyse der Zellsignalwege durch Stimulation und Transfektion

Bei 60–80% Konfluenz wurden die Zellen für 30min, 1h, 4h oder 24h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) (10^{-11} – 10^{-8} M; Sigma-Aldrich, München, Deutschland), IL-17A (10ng/ml; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland), Calcipotriol (10^{-10} – 10^{-8} M; LEO-Pharma, Neu-Isenburg, Deutschland), ZK159222, ZK191784, ZK203278 (alle 10^{-10} – 10^{-8} M; Bayer-Schering, Berlin, Deutschland) oder deren Kombinationen stimuliert. Als Negativkontrolle erfolgte ausschließlich die Zugabe der entsprechenden Menge Lösungsmittel.

Um die Cathelicidin-Promotergenaktivität zu messen, wurde ein 5000bp-Fragment der 5' Upstream-Region des humanen Cathelicidin-Gens CAMP in einen Luciferase-Reporter-Vektor (pGL-3-1500) kloniert. Ca. 24h nach Aussaat wurden die HaCaT-Zellen unter der Sterilwerkbank mit FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche, Basel,

Schweiz) und dem klonierten Plasmid transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 24-Well-Plates. Pro Well wurden 99µl serumfreies DMEM (PAA Laboratories) und 1µl FuGENE 6 verwendet. Zur Verhinderung der Adsorption des Reagenz an der Wandung der Gefäße wurde FuGENE 6 direkt in das Medium pipettiert. Nach einer Inkubation von 5min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 0,5µg des zu transfizierenden Plasmids. Als Referenzvektor wurde ein Renilla-Luciferase-Vektor verwendet und 0,02µg/µl hiervon zum Transfektionsmix hinzugegeben. Dieser inkubierte dann 30min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt und 100µl Transfektionsmix auf die Zellen pipettiert. Nach einer erneuten Inkubation von 5min bei Raumtemperatur wurden 200µl DMEM mit Zusätzen zugegeben. Die Transfektionsdauer betrug 4 Stunden. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit 1,25D3, Calcipotriol, ZK 191784, ZK203278 und ZK159222 (alle 10^{-7} M), wie oben beschrieben.

Zur Analyse der an Signalwegen beteiligten Rezeptoren und Enzyme wurden short interfering (si)RNAs benutzt. Bei ca. 30% Konfluenz wurden NHEK zweimal mit siRNA-Oligonukleotiden im Abstand von 48h transfiziert. Diese Oligonukleotide dienten zum Ausschalten des Vitamin D-Rezeptors oder der Kinasen ERK1 und 2. Die Kontrolle erfolgte mit nicht zielgerichteten Kontroll-siRNA-Oligonukleotiden. Diese wurden mit einer Endkonzentration von jeweils 20nM zu den Zellen gegeben. Zur Herstellung des Transfektionsmixes wurden je Well 1,5µl (20µM) der entsprechenden siRNA sowie 1,25µl LipofectaminTMRNAiMAX Reagent (Invitrogen) mit jeweils 125µl OPTIMEM-Medium verdünnt. Beide Verdünnungen wurden gemischt und 20min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Danach wurden die Zellen unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 4 Stunden nach der zweiten Transfektion konnten die Zellen dann mit 1,25D3, Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222 (alle 10^{-8} M) stimuliert werden. Das Ernten der Zellen erfolgte in definierten Zeitabständen, um im Anschluss die Effekte der Stimulation mittels qRT-PCR oder Western Blot auszuwerten.

2.2.2 Plasmidisolierung und Reporteranalyse

Nach Absaugen des alten Mediums und zweimaligem Waschen mit 500µl 1xPBS pro Well, wurden 100µl verdünnter 1xReporter-Lysis-Buffer (Promega, Madison, USA) hinzugegeben, die Schale geklopft und 7min bei -80°C gefroren. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst, in Eppendorfreaktionsgefäße aufgenommen und 10sek gevortext. Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei -20°C gelagert.

Je 50µl der Zellsuspension wurden in eine 96-Well-Plate pipettiert und dazu 50µl DualGloLuciferase Reagent (Luciferase-Buffer und DualGloLuciferase Substrate (beides

Promega) im Verhältnis 1:100) gegeben. Im Anschluss daran erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Probe für 15min bei Raumtemperatur. Die Messung der Luciferase-Aktivität wurde mit einem M2X Microplate Luminometer (Dynex Technologies GmbH, Berlin, Deutschland) vorgenommen. Danach wurden 50µl DualGloStop&Glow Reagent (DualGloStop&Glow Substrate und DualGloStop&Glow Buffer (beides Promega) im Verhältnis 1:100) zugegeben und wieder 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte erneut eine Messung, welche die Renilla-Aktivität bestimmte.

2.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

2.2.3.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion der gesamten RNA aus der adhären wachsenden Zellfraktion diente TRIzol Reagent (Invitrogen). Nach Absaugen des alten Mediums und Waschen der Zellen mit 1ml PBS je Well wurde 1ml TRIzol Reagent in jedes Well gegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren erfolgte die Überführung der nun homogenen Lösung in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß und die Zugabe von jeweils 200µl Chloroform (Sigma-Aldrich). Nach 15sek langem Schütteln per Hand und anschließender dreiminütiger Inkubationszeit wurden die Eppendorfreaktionsgefäße zentrifugiert (4°C; 15min; 12000U/min). Dabei kam es zur Phasentrennung. Von der oberen farblosen, wässrigen Phase wurden vorsichtig 400µl abpipettiert und in ein neues 1,5ml fassendes Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die gewünschte RNA Präzipitation wurde durch Zugabe von 500µl Isopropanol erreicht, wobei ein kurzes Schütteln per Hand und 10min Inkubation bei Raumtemperatur nötig waren. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation (4°C; 10min; 12000U/min). Der Isopropanolüberstand wurde abgegossen, das erhaltene Pellet zum Waschen mit 1ml 75%igem Ethanol gevortext und nochmals zentrifugiert (4°C; 5min; 7500U/min). Der Überstand wurde abgeschüttet und die RNA 15–20min luftgetrocknet. Die trockenen Proben konnten nun in 25µl DEPC-Wasser resuspendiert und bei –80°C gelagert werden.

2.2.3.2 cDNA-Synthese

Für die Durchführung einer qRT-PCR musste nach der RNA-Isolierung diese in cDNA umgeschrieben werden. Für die cDNA-Synthese wurde das DyNAmo™ cDNA Synthesis Kit für qRT (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Pro Ansatz wurden 10µl RT-Buffer, 1µl Random Hexamer Primer Set, 2µl M-MuLV RNase H⁺ reverse transkriptase und 7µl der jeweiligen RNA-Probe gemischt. Im Veriti™ Thermal Cycler (Applied Bio-

systems, Forster City, USA) wurden die Proben 30min bei 37°C erwärmt, anschließend 5min auf 85°C erhitzt und am Ende auf 4°C abgekühlt. Die Aufbewahrung der synthetisierten cDNA bis zum weiteren Gebrauch erfolgte bei -20°C.

2.2.3.3 qRT-PCR

Um die Expression von Cathelicidin, IL-17A, VDR, ERK1, ERK2, Psoriasin und des Housekeeping-Gens Porphobilinogen Deaminase (PBGD) quantitativ zu bestimmen wurde eine Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) etabliert. Die Wahl des Housekeeping-Gens PBGD ist begründet durch seine Zugehörigkeit zu einer „low abundance“-Klasse von mRNAs, ebenso wie Cathelicidin. Das bedeutet, dass das Expressionsniveau in unbehandelten Keratinozyten gering ist. Zuvor durchgeführte Tests belegten, dass die Expression von PBGD durch die Behandlung von HaCaT-Keratinozyten oder NHEK mit den hier verwendeten Stimulationsreagenzien nicht beeinflusst wird. Für die qRT-PCR wurde ein Mastermix des jeweiligen zu testenden Gens und PBGD vorbereitet. Pro Ansatz wurden verwendet: 0,1µl Primer PBGD (MWG, Ebersberg, Deutschland), 0,1µl Probe PBGD, je 0,2µl Primer forward und reverse des zu testenden Gens, 0,1µl Probe des zu testenden Gens, 2µl Reaktionsmix mit den notwendigen Nukleotiden (alle Reagenzien Roche) und 4,3µl bidestilliertes Wasser. Von diesem Mastermix wurden je LightCycler Kapillare 7µl zu 3µl der jeweiligen cDNA-Probe pipettiert. Nach einer Zentrifugation (4°C; 30sek; 1000U/min) erfolgte die Detektion mit Hilfe des LightCycler 2.0 Systems (Roche). Die Primersequenzen wurden nach einem Algorithmus von www.universalprobelibrary.com zusammengestellt. Die analysierten Gene und die jeweils korrespondierenden Primer sind in Tabelle 2 detailliert aufgeführt. Von allen Analysen wurden Triplikate von zwei bis drei unabhängigen Zellstimulationen angefertigt.

Zielgen	Forward	Reverse
Cathelicidin	5´ tcggatgctaacctctaccg 3´	5´ acaggcttggcgtgtct 3´
Psoriasin	5´ aagcctgctgacgatgatg 3´	5´ cgaggtaattgtgcccttt 3´
IL-17A	5´ tgggaagacctcattggtgt 3´	5´ ggatttcgtgggattgtgat 3´
VDR	5´ cttctctggggactcctct 3´	5´ tggacgagtcocatcatgtct 3´
ERK1	5´ ccctagcccagacagacatc 3´	5´ gcacagtgtccatttttaacagt 3´
ERK2	5´ ccgtgacctcaagccttc 3´	5´ gccaggccaaagtacacag 3´

Tabelle 2: Sequenzen der zur qRT-PCR verwendeten Primer

2.2.4 Western-Blot

2.2.4.1 Proteinisolierung und -aufbereitung

Nach Stimulation der oben genannten Zelllinien mit den jeweiligen Substanzen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit jeweils 1ml PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Wells zu lösen, wurde 1ml RIPA-Buffer (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdeoxycholate, 0,1% SDS, 140mM NaCl, 1mM PMSF) verwendet. Nach Zugabe von jeweils 100µl dieser Lösung je Well konnten die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst werden. Die Zellsuspension wurde in 1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 30min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (4°C; 3min; 5000U/min), um die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen. Die Überstände wurden in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt, die Pellets verworfen.

2.2.4.2 Proteinkonzentrationsmessung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCATM Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA). Hierbei wurden Proteinstandards mit definierten Konzentrationen benutzt. Von diesen wurden zunächst jeweils 2,5µl, anschließend die gleiche Menge der zu bestimmenden Proben in die Wells einer 96-Well-Plate gegeben. Nach Zugabe von jeweils 200µl der BCATM Protein Assay Reagents A und B, im Verhältnis 50:1 gemischt, musste die Platte für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubieren. Die

nun blass bis kräftig violett gefärbten Proben wurden photometrisch bei 562nm im Spektrometer (Spectra MR, Dynex) gemessen und die Probenkonzentrationen anhand der Standardkonzentrationen ermittelt.

2.2.4.3 Western-Blot

Zur gleichmäßigen Beladung des Gels wurden zunächst die jeweiligen Mengen der Proben abhängig von der Konzentration bestimmt. Pro Lane sollten 30 μ l (Gel 1,0mm x 10well) bzw. 20 μ l (Gel 1,5mm x 15well) Gesamtvolumen mit äquivalenten Proteinmengen aufgetragen werden. Ausgehend von der Probe mit der niedrigsten Konzentration wurde nun der notwendige Ausgleich mit doppelt destilliertem Wasser berechnet. Die errechneten Mengen an Probe und Wasser wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen gemischt und jeweils 7,5 μ l Sample Buffer (NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen), sowie 3 μ l Reducing Agent (NuPAGE Sample Reducing Agent, Invitrogen) zugegeben. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden gevortext, kurz abzentrifugiert und zusammen mit dem Marker (Novex Sharp Prestained Protein Standard, Invitrogen) bei 70°C im Thermoblock (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 10min inkubiert. Nach diesem Denaturierungsprozess erfolgte nochmals ein kurzes Abzentrifugieren.

2.2.4.4 Gel-Elektrophorese

Die Proteinauftrennung wurde mit Hilfe von NUPAGE Novex 10% Bis-Tris-Gelen (Invitrogen) durchgeführt. Ein Gel wurde in die Elektrophoresekammer (XCell Sure Lock, Invitrogen) eingesetzt und die Kammer mit 1xSDS Running Buffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer 20x, Invitrogen) gefüllt. Nach dem Entfernen des Kammes konnten die Proteinproben, sowie 10 μ l des Proteingrößenmarkers (Novex Sharp Prestained Protein Standard, Invitrogen) in die Geltaschen gegeben werden. Die Elektrophorese lief konstant bei 150V (BIO-RAD Power Pac 200, Hercules, USA) für ca. 55min bis die Laufbande den unteren Rand des Gels erreichte.

2.2.4.5 Blotten auf PVDF-Membran

Nach der Auftrennung wurde das Proteingemisch auf eine Invitrolon-PVDF-Membran (Invitrogen) übertragen. Diese musste zuvor für ca. 10sek in 100% Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aktiviert, mit destilliertem Wasser gewaschen und ca. 20min in NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen) eingelegt werden. Die Gelkammer wurde zerlegt und das Gel ebenfalls kurz in Transfer Buffer gelegt. In der Blotanordnung lagen Gel und Membran unmittelbar aufeinander, umgeben von Filterpapieren und

Wattepads, die zuvor ebenfalls mit Transfer Buffer getränkt wurden. Der Blot lief für 90min konstant bei 24V.

2.2.4.6 Färbung und Inkubation mit Antikörpern

Nach Beendigung des Blots wurde die Membran aus der Blotkammer genommen und 2min auf dem Schüttler (IKA-Schüttler MTS4, Staufen, Deutschland) bei Raumtemperatur in Ponceau-Färbelösung (0,1% Ponceau S (Sigma-Aldrich), 5% Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)) inkubiert. Anschließend erfolgte dreimaliges Spülen der Membran mit destilliertem Wasser. Die sichtbaren Banden dienten als erste grobe Ladekontrolle.

Für das Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1% Western Blocking Reagent (Invitrogen) gelöst in TBS (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl (Sigma-Aldrich), pH7,5) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-LL37-Antikörper aus Kaninchen (Innovagen) 1:1000 in 0,5% Western Blocking Reagent) über Nacht bei 4°C. Die nicht-gebundenen Anteile des Primärantikörpers wurden durch dreimal 10-minütiges Waschen in TBST (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl (Merck), 0,05% Tween20 (Merck), pH 7,5) entfernt. Anschließend konnte die Inkubation mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-HRP (Dako, Glostrup, Dänemark) 1:5000 in 0,5% Western Blocking Reagent) für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Erneutes Waschen in TBST entfernte wieder die nicht-gebundenen Antikörperanteile. Der gebundene Sekundärantikörper konnte nun mittels Chemilumineszenz (Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nachgewiesen werden. Hierfür wurden beide Reagenzien im Verhältnis 40:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Diese wurde nun für 5min im Dunkeln inkubiert und anschließend das überschüssige Detektionsreagenz entfernt. Die so behandelte Membran wies eine Lichtemission bei entsprechend gebundenem Antikörper auf, die mit Hilfe von Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) sichtbar gemacht werden konnte (Röntgenfilm-Entwickler KODAK X-OMAT 1000). Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen einer Sekunde und 15min.

Zur Ladekontrolle wurden als Primärantikörper α -Tubulin (Anti- α -Tubulin-Antikörper aus Kaninchen, Biozol, Eching, Deutschland) 1:50000 bzw. β -Actin (Anti- β -Actin-Antikörper aus Maus, Sigma-Aldrich) 1:5000 in Western Blocking Reagent 0,5% verwendet.

2.2.5 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen dienten bei psoriatischen Hautproben dem Nachweis von Cathelicidin. Hierfür wurden Paraffinschnitte läsionaler Hautgewebeproben entparaffiniert, mit Protease (bacterial Proteinase; Sigma) demaskiert und über Nacht mit hCAP18/LL-37-Antikörper aus Kaninchen (Innovagen, Lund, Schweden), 1:100 in PBS gelöst, inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein nur mit PBS behandelter Schnitt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Brückenantikörper Maus-anti-Kaninchen (Dako), 1:100 in 12,5% BSA/PBS, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wieder zweimal mit PBS gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit einem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Dako), 1:20 verdünnt in 12,5% BSA/PBS, für 30min bei Raumtemperatur. Zur Visualisierung wurde nun zunächst APAAP (alkalische Phosphatase; Dako), 1:50 verdünnt in 12,5% BSA/PBS, für eine Inkubationszeit von 30min zugegeben und, nach mehrfachem Waschen mit PBS, mit dem SigmaFast Red TR/Naphthol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tablets Set (Sigma-Aldrich) für weitere 12min inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die so angefärbten Paraffinschnitte wurden mit dem TissueFAXS System Microscop (TissueGnostics, Wien, Österreich) bei 100- bis 200facher Vergrößerung analysiert und dokumentiert.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenz sollte ebenfalls Cathelicidin in der Haut von Psoriasispatienten nachgewiesen werden. 4mm-Stanzbiopsien wurden vor und 5 bis 7 Tage nach Calcipotriol-Behandlung (Daivonex®-Salbe; siehe 2.1.1) aus Psoriasisläsionen entnommen. Aus den Biopsien wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert. Zur Weiterbehandlung wurden die Schnitte nun bei Raumtemperatur aufgetaut und für eine Stunde getrocknet. Die Fixierung erfolgte bei 4°C in Aceton, gefolgt von einem weiteren Trocknungsvorgang für 30min bei Raumtemperatur. Gewaschen wurden die Gefrierschnitte mehrfach in PBS. Durch die 15minütige Inkubation mit 20% BSA/PBS wurde die Blockierung der freien Bindungsstellen erreicht, um anschließend den Primärantikörper gegen LL-37 (aus Kaninchen, 1:200 in PBS gelöst; Innovagen) binden zu lassen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper NorthernLights™ Esel-anti-Kaninchen (R&D Systems) 1:200 in PBS gelöst und für die Dauer von einer Stunde im Dunkeln in einer feuchten Kammer auf den Gewebeschnitten inkubiert. Anschließend wurden diese erneut mit PBS gewaschen und nach Zugabe von etwas DAPI ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) mit dem aufgesetzten Deckgläschen über Nacht getrocknet. Die

Präparate wurden am nächsten Tag mit dem Tissue FAXS System Microscop (TissueGnostics) betrachtet und mit Hilfe der Tissue Quest Software analysiert.

2.3 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Zur Berechnung statistischer Unterschiede in Versuchen mit HaCaT-Zellen und NHEK diente der Student's *t* Test. Die Auswertung der aus Patienten- und Probandenbiopsien gewonnenen Daten erfolgte mittels Mann-Whitney test. $P < 0,05$ wurde als Signifikanzniveau angenommen und alle Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von antimikrobiellen Peptiden und IL-17A in läsionaler psoriatischer vs. gesunder Haut nach Behandlung mit Calcipotriol

Vitamin D3-Analoga werden häufig und erfolgreich bei der Psoriasisbehandlung eingesetzt. Die Wirkungen dieser Stoffe und die zugehörigen Signalwege sind jedoch nicht im Einzelnen bekannt. Erwiesen ist aber, dass die Stimulation von Hautzellen mit Vitamin D3 *in vitro* eine Veränderung der Expression antimikrobieller Peptide, wie beispielsweise Cathelicidin hCAP18/LL-37, bewirkt (28, 31, 32). Bekannt ist auch, dass die Behandlung zu einer Besserung der psoriatischen Symptomatik führt (52, 58, 61).

Wie bereits mehrfach beschrieben, sind in läsionaler Haut von Psoriasispatienten diverse antimikrobielle Peptide erhöht, darunter auch Cathelicidin und die β -Defensine. Auch wir konnten in unseren Paraffinschnitten von Psoriasis-Hautproben mit Hilfe von Antikörper-Färbungen eine solche Erhöhung nachweisen (Abbildung 6).

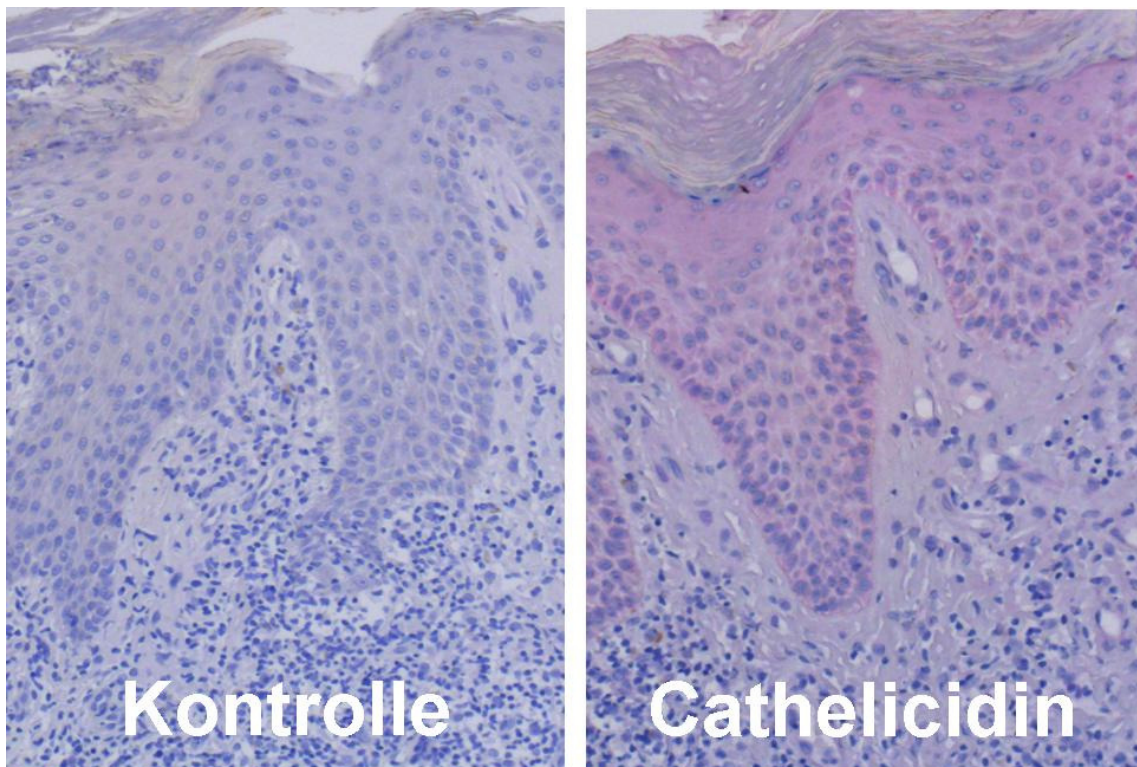


Abbildung 6: Paraffinschnitte von Psoriasispatienten entnommen aus psoriatischen Plaques. Durch das Anfärben der Schnitte mit einem hCAP18/LL-37-Antikörper wird deutlich, dass eine starke Cathelicidin-Expression in läsionaler Haut auftritt.

In den letzten Jahren haben mehrere Studien ergeben, dass Cathelicidin neben seiner antimikrobiellen Wirkung auch das adaptive Immunsystem beeinflusst. Aufgrund dieser Funktion wurde der Begriff „Alarmin“ eingeführt (6). Um die Genexpression von Cathelicidin und anderen an der Entzündungskomponente beteiligten Stoffen, wie IL-17A, bei Psoriatikern im Vergleich zu Gesunden zu untersuchen, wurden Hautproben von Patienten und gesunden Probanden, wie unter 2.1.1 beschrieben, entnommen und mittels qRT-PCR die relative Expression von Cathelicidin, IL-17A und Psoriasin bestimmt. Zusätzlich sollte verglichen werden, welche Auswirkungen eine Therapie mit Calcipotriol-haltiger Salbe, einem Vitamin D3-Analogon, auf die Expression dieser Stoffe hat. Hierfür wurden ebenfalls Biopsien von Psoriasispatienten entnommen. Tatsächlich fanden sich signifikant erhöhte Spiegel von Cathelicidin und Psoriasin in den Proben der Psoriasis-Haut (Abbildung 7). Auch Entzündungsmarker wie IL-17A waren, wie auch in früheren Studien (110), erhöht. Topische Behandlung mit Calcipotriol reduzierte die kutane Entzündung. Dies wurde nicht nur im klinischen Bild der Haut sichtbar, sondern zeigte sich auch in der Analyse der Entzündungsmarker: Die IL-17A-Werte waren nach der Therapie signifikant reduziert (Abbildung 8). Im Gegensatz dazu führte die Calcipotriol-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung der Cathelicidin-Werte. Die Psoriasin-Expression blieb unbeeinflusst.

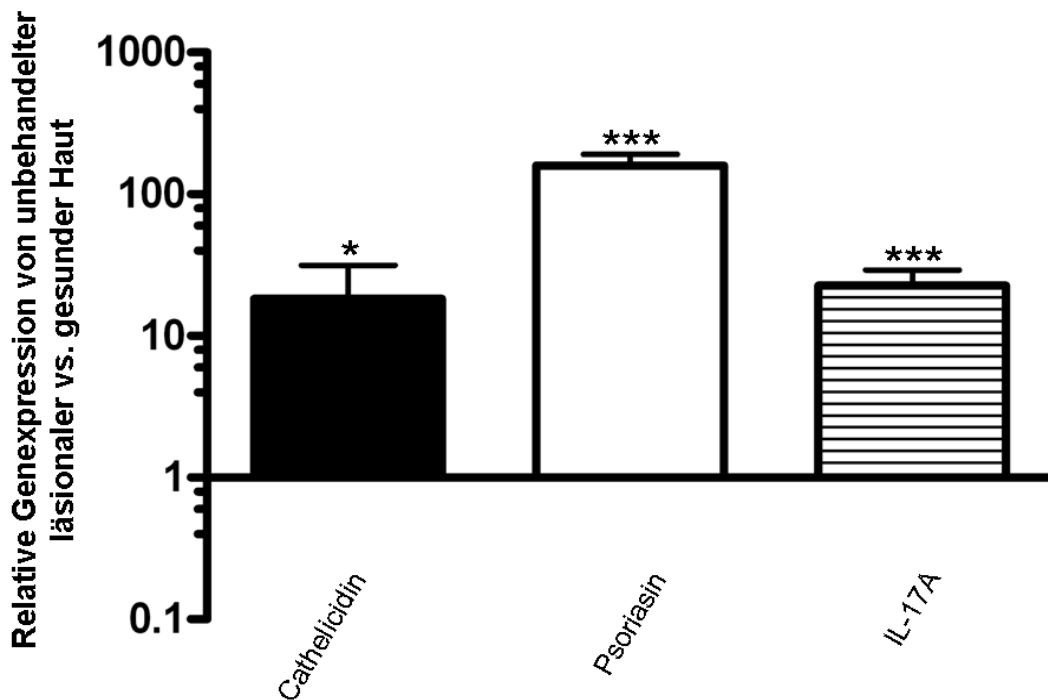


Abbildung 7: Expression antimikrobieller Peptide und IL-17A in nicht behandelter läsionaler Haut von Psoriasispatienten im Vergleich zu gesunder Haut. Die 4mm-Stanzbiopsien wurden gesunden Probanden und Psoriatikern entnommen. Nach der mRNA-Extraktion wurden die Level von Cathelicidin, IL-17A und Psoriasin mittels qRT-PCR ausgewertet

und zueinander ins Verhältnis gesetzt (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney Test). Zur besseren Übersicht wurde eine logarithmische Darstellung gewählt.

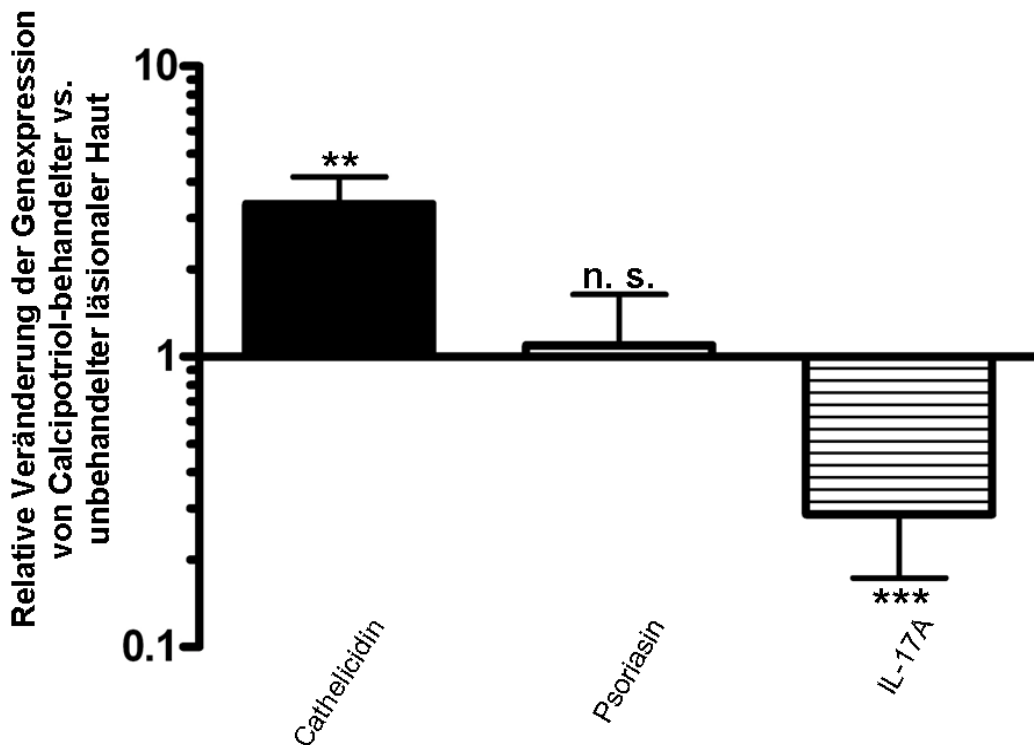


Abbildung 8: Expression antimikrobieller Peptide und IL-17A vor und nach der Behandlung mit dem Vitamin D3-Analogen Calcipotriol. Die 4mm-Stanzbiopsien wurden vor und nach 5- bis 7-tägiger topischer Calcipotriol-Therapie (Daivonex®-Salbe, 0,005%, zweimal täglich aufgetragen) von Psoriasispatienten (n=8) entnommen. Nach der mRNA-Extraktion wurden die Level von Cathelicidin, IL-17A und Psoriasisin mittels qRT-PCR ermittelt (n.s. = nicht signifikant, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney Test). Die zueinander ins Verhältnis gesetzten Messwerte wurden logarithmisch dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit zu prüfen, ob Cathelicidin auch *in vivo* nach Stimulation mit Vitamin D3-Analoga vermehrt gebildet wird, ergab sich mittels Antikörper-Färbung und Immunhistofluoreszenz. So wurden vor und nach Calcipotriol-Behandlung (Daivonex®-Salbe, siehe 2.1.1) entnommene Hautbiopsien psoriatischer Läsionen entsprechend eingefärbt und damit das exprimierte Cathelicidin sichtbar gemacht (Abbildung 9). Nach der Behandlung mit dem Vitamin D3-Analogen ist deutlich mehr rot gefärbtes Cathelicidin im Zytoplasma erkennbar. Die Expression dieses antimikrobiellen Peptids ist nach der Behandlung folglich erhöht.

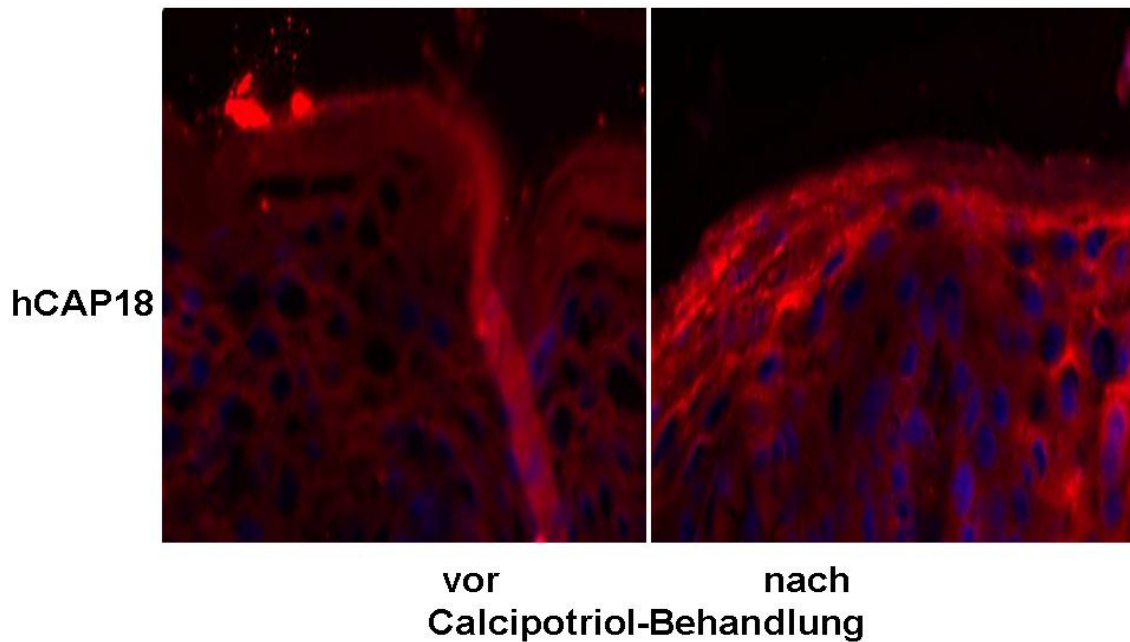


Abbildung 9: Die aus psoriatischen Läsionen vor und nach Calcipotriol-Behandlung entnommenen Gewebebiopsien wurden in Form von Gefrierschnitten mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zur Beobachtung der Cathelicidin-Expression *in vivo* wurden die Hautschnitte mit einem Cathelicidin-Antikörper gefärbt. So konnte über die Menge des gebundenen und damit rot leuchtenden Farbstoffs auf die Entwicklung der Cathelicidin-Expression unter Einfluss eines 1,25D3-Analogons geschlossen werden.

3.2 Effekte von Vitamin D3-Analoga auf die Cathelicidin-Expression in kultivierten Keratinozyten

Aktives 1,25D3 induziert die Cathelicidin-Expression in humanen Keratinozyten (28, 31, 32). Um zu untersuchen, ob Vitamin D3-Analoga ähnliche Effekte haben, also auch für eine Induktion dieser Expression sorgen und wie ausgeprägt diese bei den unterschiedlichen Analoga *in vitro* ist, wurden Keratinozyten mit 1,25D3 und dessen Analoga Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222 stimuliert und die Effekte auf verschiedenen Ebenen der zellulären Expression betrachtet.

Um die Effekte der Vitamin D3-Analoga auf die Cathelicidin-Promoteraktivität *in vitro* zu testen, wurde eine Reporteranalyse durchgeführt (Abbildung 10). Ein 5kb-Fragment des 5' Upstream-Bereichs des humanen Cathelicidin-Gens CAMP wurde wie unter 2.2.1 beschrieben in HaCaT-Keratinozyten transfiziert und diese anschließend mit oben genannten Substanzen stimuliert. Die Auswertung der relativen Luciferaseaktivität ergab eine Steigerung der Cathelicidin-Promoteraktivität bei allen getesteten Analoga in unterschiedlicher Ausprägung. So zeigte beispielsweise Calcipotriol eine ähnlich starke Wirkung, wie Vitamin D3 selbst, nämlich eine mehr als 20-fache Steigerung verglichen mit unstimulierten Zellen. Auch ZK203278 hatte eine relativ hohe Wirkung mit mehr als 15-facher Promoteraktivierung. Die Effekte von ZK191784 und ZK159222

sind dagegen eher gering. Diese Substanzen haben im Zusammenspiel mit stärker wirkenden Analoga sogar einen partiell antagonistischen Effekt (Abbildung 20).

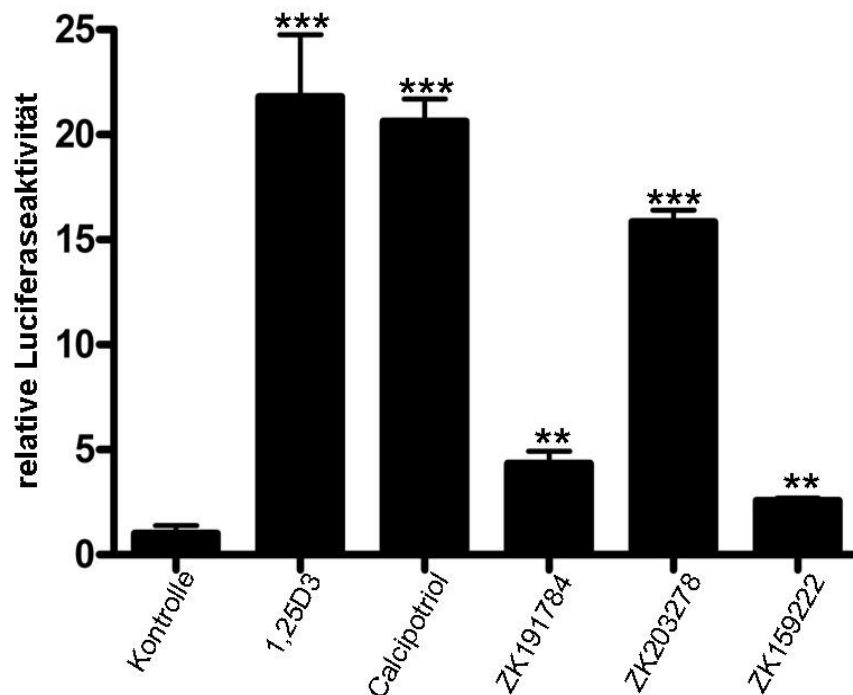


Abbildung 10: Reportergen-Analyse zur Ermittlung der Cathelicidin-Promoter-Aktivität nach Stimulation mit 1,25D3, Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222. Wie in 2.2.1 beschrieben, wurde ein 5kb-Fragment der 5' Region des humanen CAMP in einen Luciferase-Reporter-Plasmid kloniert und anschließend in HaCaT-Keratinocyten transfiziert. Die Stimulation erfolgte mit allen Substanzen in einer Konzentration von 10^{-7} M. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität ermittelt (**P < 0,01, ***P < 0,001; Student's t Test).

Die Induktion der Cathelicidin-Transkription ergab auch in der qRT-PCR unterschiedliche Ausprägung bei verschiedenen Analoga (Abbildung 11). Die Analoga zeigten bei Stimulation der primären Keratinozyten (NHEK) in gleicher Konzentration folgende Effekte: Calcipotriol induzierte die Cathelicidin-mRNA-Expression ähnlich stark wie 1,25D3, ZK203278 etwas und ZK191784 deutlich weniger, den geringsten Effekt hatte ZK159222. Diese Effekte zeigten sich in allen folgenden Experimenten in ähnlicher Ausprägung und Verteilung.

Die gesteigerte mRNA-Expression von Cathelicidin war zeit- und dosisabhängig. Eine Stimulation mit Calcipotriol in einer Konzentration von 10^{-10} M bewirkte eine Steigerung um das ca. 15-fache und mit einer Konzentration von 10^{-9} M um das 21-fache verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. Wurden 10^{-8} M Calcipotriol verwendet, konnte die Expression von Cathelicidin um das 70-fache erhöht werden. ZK191784, ZK203278 und ZK159222 verhielten sich dabei ähnlich, in ihrer Stärke jedoch entsprechend zu ihrer in Abbildung 10 gezeigten Wirksamkeit. Das heißt, ZK203278 hatte ebenfalls starke Effekte, vor allem in der höchsten Konzentration von 10^{-8} M ergab sich eine Stei-

gerung um den Faktor 47, während die Expression bei 10^{-10}M eine Erhöhung um den Faktor 8 brachte. Die Stimulation mit ZK191784 hatte insgesamt eine deutlich geringere Wirkung, wobei die Differenz zwischen 10^{-9}M (Steigerung um Faktor 15 verglichen mit unstimulierter Kontrolle) und 10^{-8}M (Faktor 19) verhältnismäßig gering ausfiel. Das gleiche Muster findet sich bei ZK159222, nämlich die gesteigerte Cathelicidin-Expression um das 4-fache bei 10^{-9}M und nur um das 5-fache bei stärkster Konzentration.

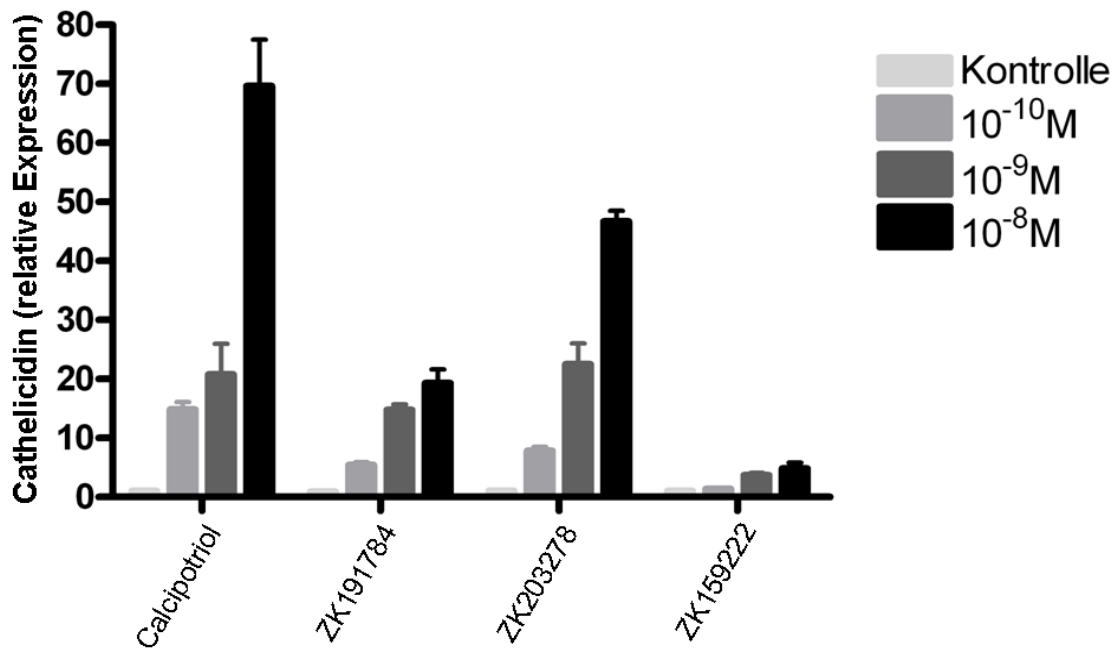


Abbildung 11: qRT-PCR der mit Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222 stimulierten NHEK. Untersucht wurde die Dosisabhängigkeit der jeweiligen Stimulationen. Hierfür wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-10}M , 10^{-9}M und 10^{-8}M), aber gleich bleibender Stimulationsdauer (immer 24h) experimentiert. Die Auswertung erfolgte anschließend in einer qRT-PCR relativ zur unstimulierten Kontrolle.

Um die Zeitabhängigkeit der Cathelicidin-Induktion durch Vitamin D3-Analoga zu überprüfen, wurden NHEK über unterschiedliche Zeiträume stimuliert. Exemplarisch sind in Abbildung 12 die Effekte von Calcipotriol und ZK191784 dargestellt. Die Zeitabhängigkeit des Effektes der getesteten Analoga wird besonders deutlich bei der Stimulation mit Calcipotriol: Nach Steigerung der Transkription auf das Doppelte nach einer Stunde erhöhte sich die Menge innerhalb von drei weiteren Stunden auf das 10-fache. Die Stimulationszeit von vier Stunden ergab bei beiden Substanzen eine deutliche Steigerung der Cathelicidin-Expression.

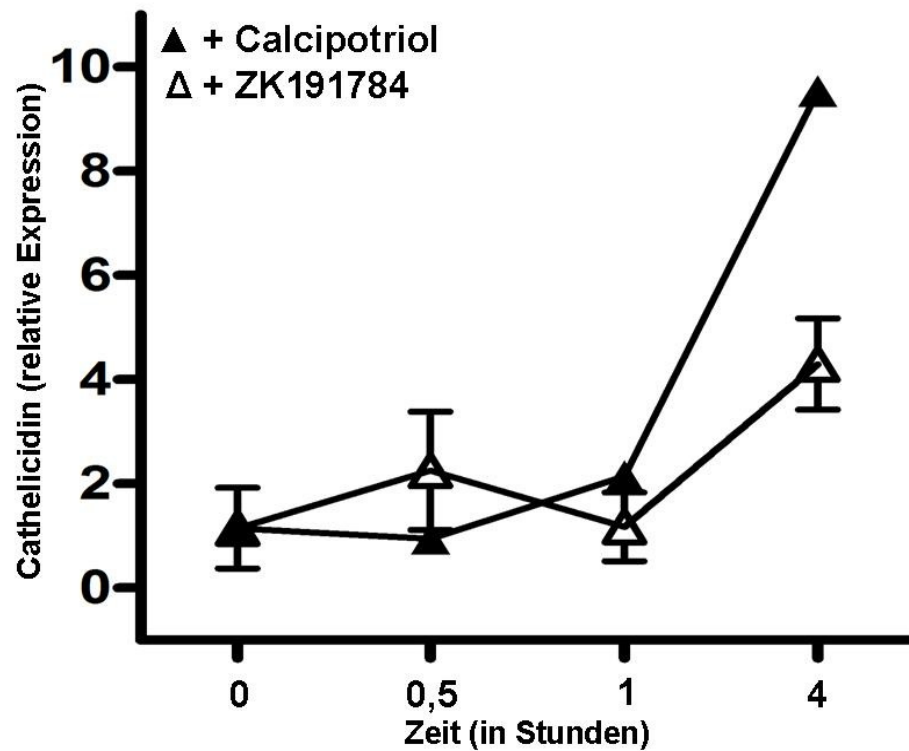


Abbildung 12: NHEK wurden mit den Analoga Calcipotriol und ZK191784 in einer Konzentration von 10^{-8} M über 30min, eine Stunde und vier Stunden stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion und deren Untersuchung mittels qRT-PCR. Die Auswertung erfolgte relativ zur unstimulierten Kontrolle.

Die Analyse der Proteinproduktion (Abbildung 13) von NHEK nach Stimulation mit 1,25D3 und dessen Analoga in gleicher Konzentrationen ergab ein ähnliches Ausprägungsmuster des Vorläufermoleküls hCAP18 wie in der oben abgebildeten Reporteranalyse (Abbildung 10) und der qRT-PCR (Abbildung 11). Das aktive LL-37 Peptid selbst konnte in keinem Blot nachgewiesen werden. Mögliche Gründe dafür werden in Abschnitt 4 eingehend diskutiert.

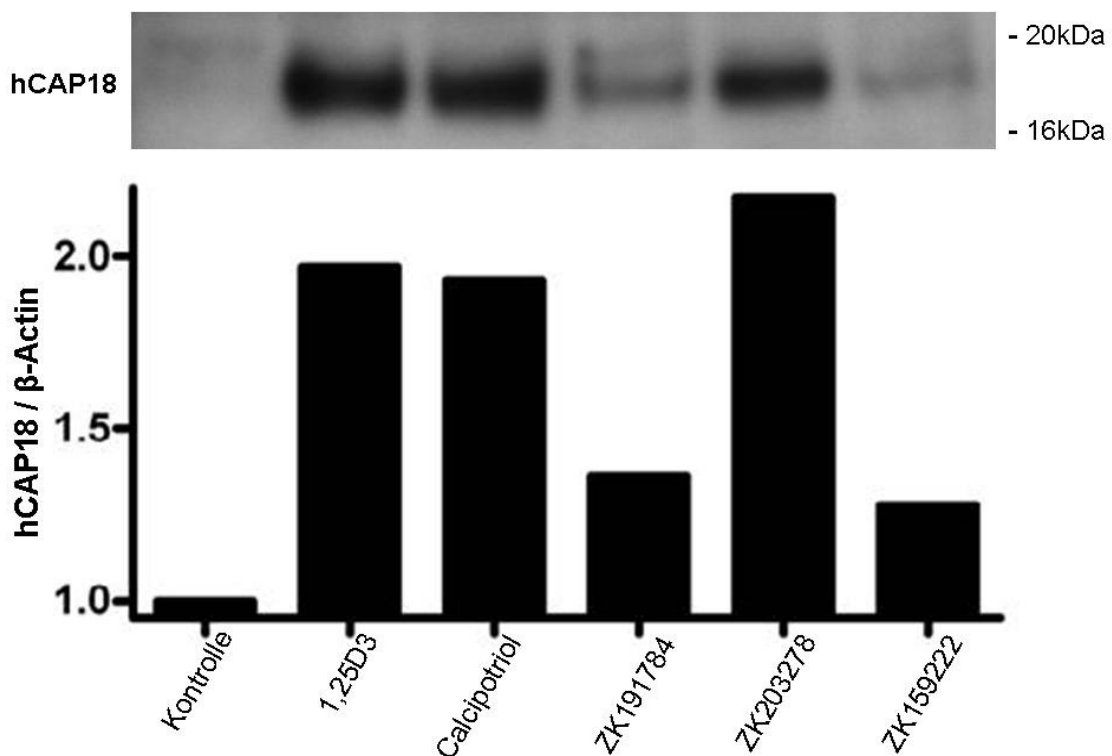


Abbildung 13: Um die Induktion der Cathelicidin-Expression auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden NHEK mit 1,25D₃ und den Analoga (alle 10⁻⁸M) stimuliert und die Proteine nach 24h extrahiert. Nach Auftrennung im Western Blot und Übertragung auf eine PVDF-Membran konnten die gesuchten hCAP18-Banden mit Erst- und Zweit-Antikörper angefärbt und anschließend detektiert werden. Zur statistischen Auswertung wurde zusätzlich eine Antikörper-Färbung mit β -Actin als Ladekontrolle angefertigt (Daten nicht gezeigt) und die Ausprägung der entsprechenden Banden verglichen.

3.3 Auch Vitamin D3-Analoga wirken über den Vitamin D3-Signalweg

Da Vitamin D3-Analoga zwar ähnliche Wirkungen haben wie Vitamin D3, aber die Effekte nicht vollkommen identisch sind, sollte nun überprüft werden, ob und welche Abweichungen des Signalwegs verglichen mit 1,25D₃ bestehen.

3.3.1 Vitamin D3-Analoga wirken über den Vitamin D-Rezeptor

Es ist bekannt, dass 1,25D₃ über den sogenannten Vitamin D-Rezeptor (VDR) wirkt (78, 81). Um nun festzustellen, ob auch die Analoga über den VDR wirken, wurde dieser mittels VDR-siRNA ausgeschaltet (siehe 2.2.1). Sowohl auf RNA- (Abbildung 15), als auch auf Proteinebene (Abbildung 16) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Cathelicidin-Expression verglichen mit den mit Kontroll-siRNA transfizierten NHEK. Zur Überprüfung des Erfolges dieser Transfektion wurde die Transkription des VDR selbst

in einer qRT-PCR überprüft, die zeigte, dass die VDR-Expression um etwa 80% reduziert war.

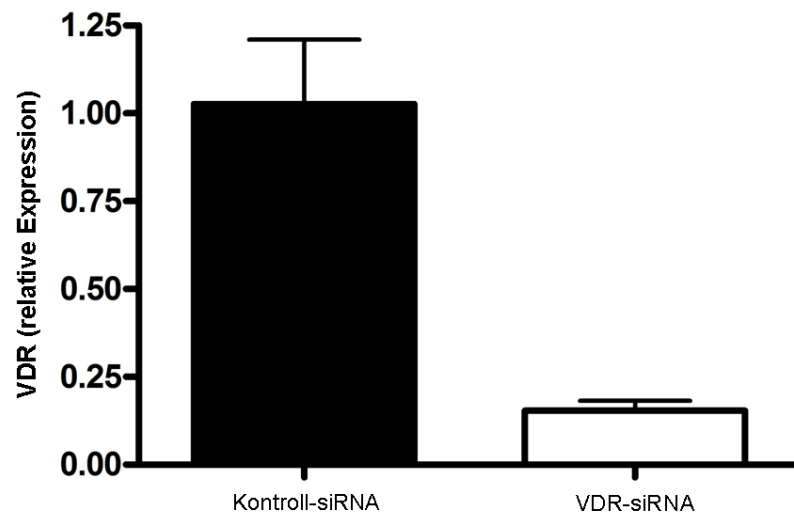


Abbildung 14: Kontrolle des Effektes der VDR-siRNA auf die Transkription des Vitamin D-Rezeptors. Die Transfektion verlief erfolgreich, da die Expression des VDR relativ zur Kontroll-siRNA um mehr als 80% reduziert werden konnte.

Nach Herunterregulation des VDR durch die entsprechende siRNA wurde eine signifikante Reduktion des Transkripts sichtbar. In mit Calcipotriol stimulierten Zellen wurde die Induktion der Cathelicidin-Expression vom 47-fachen Wert verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen auf den 18-fachen Wert reduziert. Das heißt, es erfolgte eine signifikante Verringerung um 62%. Die Expression von Cathelicidin verminderte sich bei einer Stimulation mit ZK191784 auf 34% und bei ZK203278 auf ein Drittel des Wertes verglichen mit Zellen mit intaktem VDR.

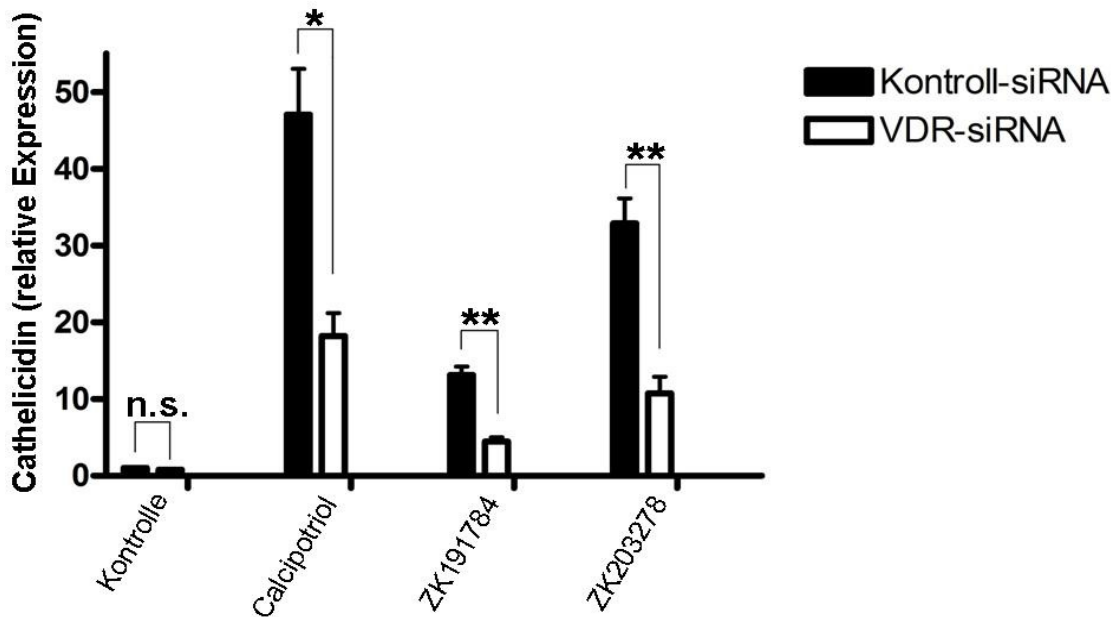


Abbildung 15: qRT-PCR der mit Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 (alle 10^{-8} M) stimulierten NHEK. Die Kontrollzellen wurden mit Kontroll-siRNA transfiziert, die anderen Zellen mit VDR-siRNA, um den Vitamin D-Rezeptor auszuschalten. Anschließend erfolgte die Stimulation mit o.g. Substanzen über 24h. Die Induktion der Cathelicidin-Expression wurde mittels einer qRT-PCR analysiert (n.s. = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01; Student's *t* Test).

Auch auf Protein-Ebene sollte die Beteiligung des VDR am Signalweg der Analoga überprüft werden. Hierfür wurden NHEK wie zuvor beschrieben mit Kontroll-siRNA und VDR-siRNA transfiziert und anschließend mit den Analoga stimuliert. Die α -Tubulin-Bande zeigte eine gleichmäßige Gelbeladung. Um zu überprüfen, ob die Herunterregulation des VDR funktioniert hat, wurde dessen Protein-Ausschüttung analysiert (Abbildung 16). Die entsprechenden Proteinbanden bewiesen die Abnahme des VDR in den Keratinozyten nach Behandlung mit VDR-siRNA. In Höhe der 18kDa-Bande, also des LL-37-Vorläuferproteins hCAP18, wurde die bereits nachgewiesene Verteilung erkennbar: Calcipotriol zeigte die größten Effekte, ZK203278 ergab ebenfalls eine deutliche und ZK191784 eine etwas schwächere Bande. Die Verringerung der Effekte im Bereich der VDR-siRNA-transfizierten Banden war gut zu erkennen.

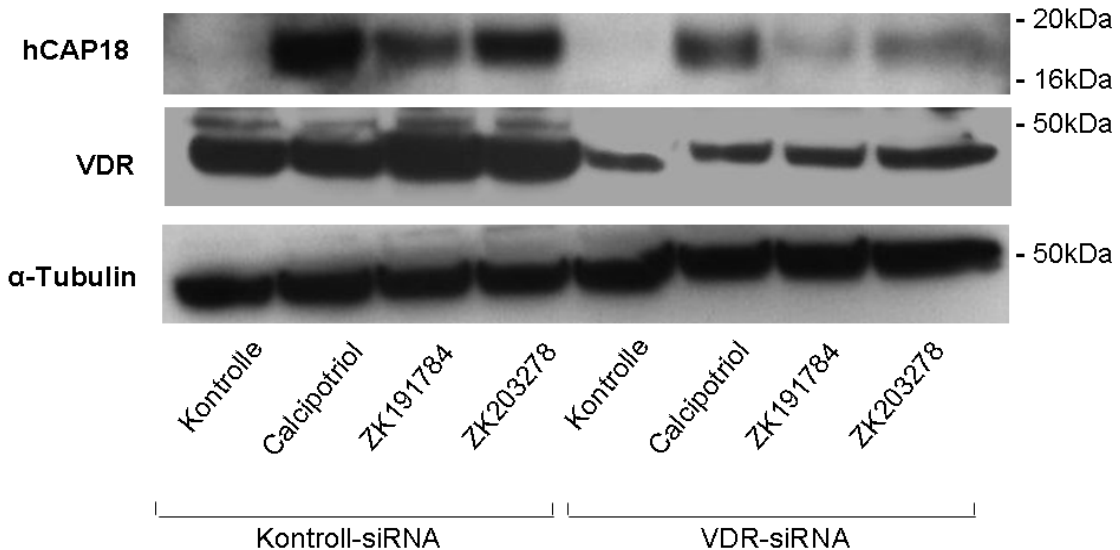


Abbildung 16: Western Blot der mit Kontroll- und VDR-siRNA transfizierten NHEK. Die Keratinozyten wurden nach der Transfektion mit Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 in einer Konzentration von 10^{-8} M für 24h stimuliert. α -Tubulin diente hier als Ladekontrolle.

3.3.2 Der MEK/ERK-Signalweg ist beteiligt an der Wirkung der Vitamin D3-Analoga

In diversen Studien wurde nachgewiesen, dass der MEK/ERK-Signalweg, insbesondere die Kinasen MEK, sowie ERK1 und 2, ebenfalls an der Wirkung von Vitamin D3 auf die Cathelicidin-Expression beteiligt sind (12). In unseren Experimenten erhielten wir das gleiche Ergebnis. Die Annahme, die Analoga wirken auch über diese Signalkaskade, wurde auf zwei verschiedene Weisen untersucht. Zuerst wurde der spezifische MEK1-Inhibitor PD98059 benutzt, um MEK1 zu hemmen (Abbildung 17). Die Expression von Cathelicidin auf RNA-Ebene war bei den so vorbehandelten NHEK signifikant reduziert verglichen mit den Kontroll-Stimulationen. Bereits bei unstimulierten Kontrollzellen betrug die Cathelicidin-Expression nach Inkubation mit PD98059 im Mittel nur noch 30%. Eine ebenfalls signifikante Reduktion ergab sich bei Stimulation mit ZK191784. Hier reduzierte der Einfluss des MEK1-Inhibitors die Transkription auf 40% des Kontrollwertes. Bei einer Stimulation mit ZK203278 zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion (um 43%). Die Stimulationen mit Calcipotriol und ZK159222 ergaben zwar auch eine Hemmung der Cathelicidin-Expression, die jedoch nicht signifikant war.

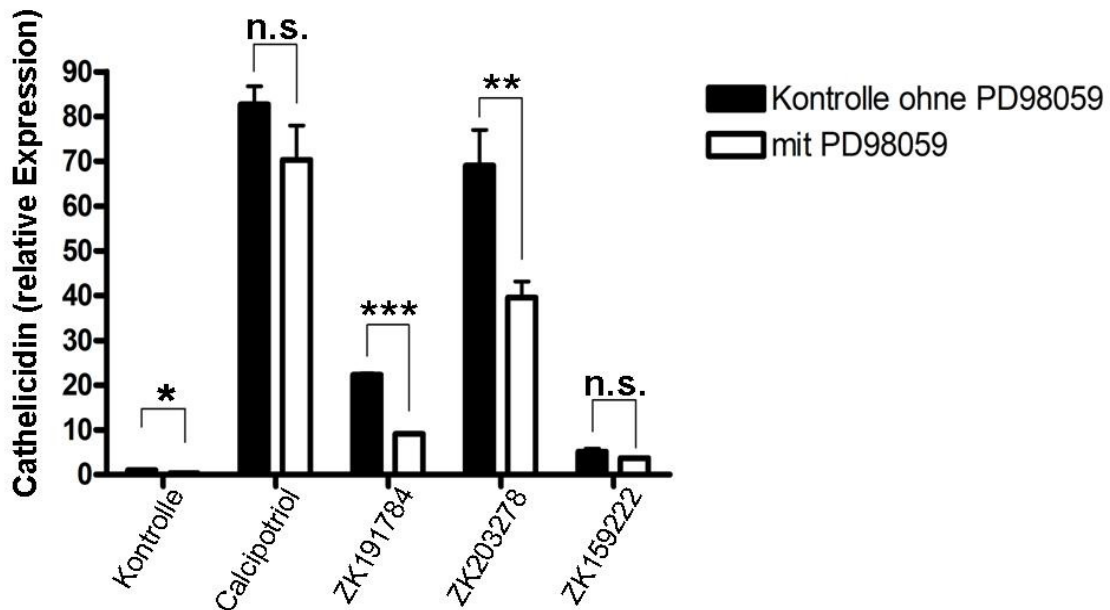


Abbildung 17: NHEK nach 2-stündiger Inkubation mit dem spezifischen MEK1-Inhibitor PD98059 und anschließender Stimulation mit Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222 (alle 10^{-8} M). Die Auswertung erfolgte mittels qRT-PCR (n.s. = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Student's *t* Test).

Als nächstes wurde die Expression von ERK1 und 2 herunterreguliert. Hierfür sorgte die Transfektion mit entsprechenden siRNAs. Die Herunterregulation der beiden Kinasen wurde mittels qRT-PCR bestätigt (Abbildung 18). Tatsächlich verringerte sich die Expression von ERK1 auf weniger als ein Zehntel und von ERK2 auf 28% des Referenzwertes der Kontrollzellen.

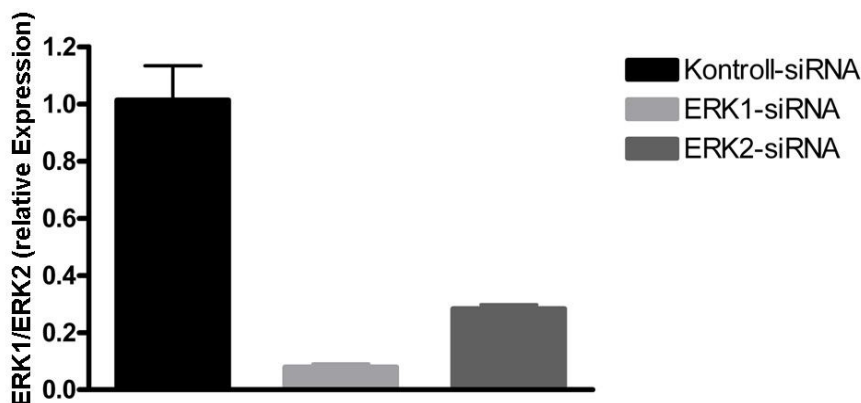


Abbildung 18: qRT-PCR zur Kontrolle der Herunterregulation der Kinasen ERK1 und ERK2. Nach zweimaliger Transfektion im Abstand von 48h wurden die unstimulierten Keratinozyten mit Hilfe einer qRT-PCR auf die Expression beider Kinasen hin überprüft. Der Einsatz der siRNAs hatte auf ERK1 eine größere Wirkung als auf ERK2.

Durch die Inhibierung des MEK/ERK-Signalwegs nahm die Expression von Cathelicidin nach Stimulation mit 1,25D3, Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 deutlich ab (Abbildung 19). Schon die unstimulierten Kontrollzellen reduzierten die Cathelicidin-

Transkription auf weniger als ein Zehntel der Menge, die in mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gemessen wurde. Bei Stimulation mit 1,25D3 konnte eine Senkung um 65% beobachtet werden, bei ZK 191784 sogar um 70%. Die Reaktion auf die Transfektion bei Stimulation mit ZK203278 und Calcipotriol fiel mit 39% und 21% Reduktion deutlich geringer aus. Nichtsdestotrotz wird die Beteiligung der Kinasen ERK1 und 2 am Signalweg der Vitamin D3-Analoga deutlich.

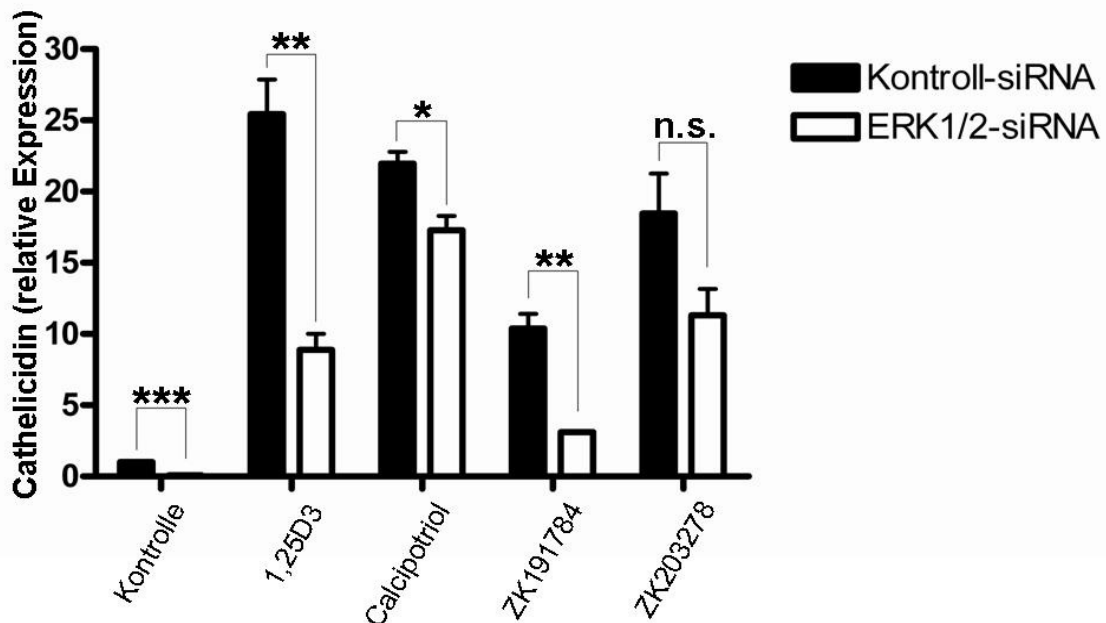


Abbildung 19: Um den Einfluss von ERK1 und ERK2 zu reduzieren, wurden die Keratinozyten (NHEK) vor der Stimulation mit entsprechenden siRNAs (je 20nM) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1,25D3 selbst und den Analoga Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 (alle 10^{-8} M) über 24 Stunden. Die Auswertung der Transkriptionsänderung erfolgte durch qRT-PCR (n.s. = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001; Student's *t* Test).

3.3.3 IL-17A verstärkt die Effekte von Vitamin D3 und dessen Analoga auf die Cathelicidin-Expression.

In einer vorangegangenen Publikation unserer Arbeitsgruppe (12) wurde bereits nachgewiesen, dass die Effekte von 1,25D3 auf die Cathelicidin-Expression und hCAP18-Produktion durch die Anwesenheit von IL-17A verstärkt werden. Nun sollte auch untersucht werden, ob dieser Effekt ebenfalls bei der Stimulation mit den entsprechenden Analoga zu beobachten ist. Die Ergebnisse zeigten wie erwartet keine Wirkung von IL-17A allein, aber eine Verstärkung der Cathelicidin-mRNA-Expression bei Anwesenheit eines der Analoga (Abbildung 20). Die Cathelicidin-Expressionssteigerung durch IL-17A in Anwesenheit der Analoga korrelierte mit den vorherigen Induktionen bei Stimulation mit den Analoga allein. Exemplarisch wird in Abbildung 15 gezeigt, wie sich die Expression des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin verhält, wenn mit 1,25D3 selbst,

in Kombination mit seinem Analogon ZK191784 und mit dem Interleukin-17A zusammen stimuliert wird. Hierbei wirkte ZK191784 aufgrund seiner vergleichsweise gering ausgeprägten Wirkung eher als Antagonist und schwächte die starke Stimulation durch 1,25D3. Daher wurde dessen Wirkung bei einer kombinierten Stimulation um 59% reduziert. IL-17A dagegen verstärkt den Effekt, sowohl von Vitamin D3, als auch der Analoga. Beispielsweise wurde durch IL-17A die durch ZK191784 hervorgerufene Cathelicidin-Expression mehr als verdoppelt, bei Stimulation kombiniert mit 1,25D3 steigerte sie sich sogar auf 214%.

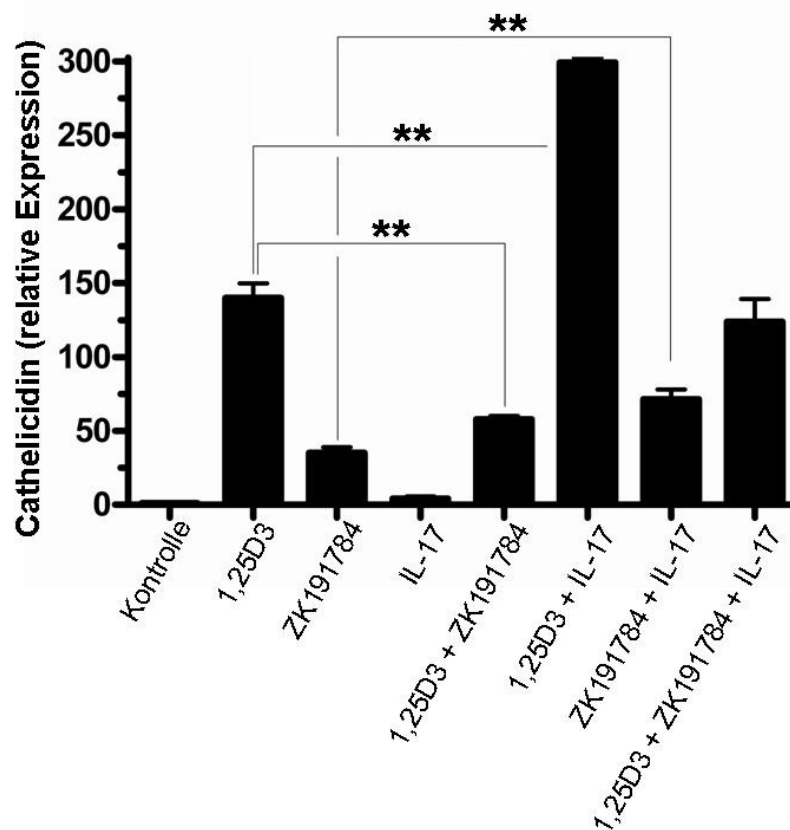


Abbildung 20: qRT-PCR der mit 1,25D3, ZK191784 (beide 10^{-8} M) und IL-17A (10ng/ml) stimulierten Keratinozyten. Der Versuch diente der Ermittlung des Einflusses des Interleukins-17 und der geringer wirksamen Analoga auf die Cathelicidin-Expression und deren gegenseitige Beeinflussung. Die Stimulationen erfolgten gleichzeitig und über eine Dauer von 24h. Anschließend wurde die Cathelicidin-Expression mittels qRT-PCR ausgewertet (**P < 0,01; Student's *t* Test).

4 Diskussion

4.1 Antimikrobielle Peptide in läsionaler psoriatischer Haut

Die Haut ist für den menschlichen Organismus ein unerlässliches Organ, dessen Aufgabe unter anderem im Schutz anderer Gewebe und Organe besteht. Bei Störungen innerhalb dieser Barriere werden schnell Abwehrmaßnahmen eingeleitet. Zunächst reagiert der schnellere, angeborene Teil des Immunsystems, später die viel spezifischeren, adaptiven Mechanismen. Eine Brücke zwischen beiden Teilen der körpereigenen Abwehr schlagen die antimikrobiellen Peptide (AMP), wie beispielsweise Defensine und Cathelicidine. Sie wirken zum einen selbst als eine Art „körpereigener Antibiotika“, haben aber zum anderen eine Vielzahl weiterer Aufgaben, die zum Beispiel zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen.

Das Cathelicidin-Peptid LL-37 wird in gesunder Haut nur in sehr geringen Mengen exprimiert, wobei in Bereichen bakterieller Infektionen oder Verletzungen dann die Expression erhöht wird. Auch ein Zusammenhang mit verschiedenen Hauterkrankungen wird seit Längerem untersucht. Psoriasis ist eine weit verbreitete Erkrankung, an der ca. 2% der Gesamtbevölkerung weltweit leiden (111). In läsionaler Haut dieser Patienten wurden stark erhöhte Mengen verschiedener antimikrobieller Peptide, darunter Cathelicidin, Psoriasin und die humanen β -Defensine-2 und -3, nachgewiesen (62). Die Haut in den betroffenen Bereichen zeigt typischerweise starke Entzündungszeichen, die sich sowohl im klinischen Bild, als auch in der Analyse der vorhandenen Entzündungsmarker und -mediatoren widerspiegeln. IL-17A, ein für Hautentzündungen charakteristisches proinflammatorisches Zytokin, war in den hier entnommenen und untersuchten Biopsien läsionaler Haut, verglichen mit gesunder Haut, stark erhöht. Gleiches gilt für IL-8, welches ebenfalls ein proinflammatorischer Marker ist (62). Auch die erhöhte Expression von Cathelicidin und Psoriasin konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden.

4.2 Vitamin D3-Analoga und deren Einfluss auf die Expression antimikrobieller Peptide *in vivo*

Die Produktion und Ausschüttung von Cathelicidin wird in Keratinozyten direkt über die Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR) reguliert, was auf das Vitamin D-responsive Element (VDRE) im Cathelicidin-Promoter zurückgeführt werden kann (28, 31, 32). Hier ergibt sich also die Möglichkeit, therapeutisch einzugreifen. Daher bedient

man sich schon seit Jahrhunderten der Sonnenexposition und damit der Anregung körpereigener Vitamin D₃-Synthese in der Psoriasis-Behandlung. Aufgrund der kanzerogenen Nebenwirkungen dieser vermehrten Bestrahlung, wurden später 1,25D₃-Präparate zur systemischen und lokalen Therapie eingesetzt. Die immunmodulatorischen Eigenschaften von 1,25D₃ machten es zu einem vielversprechenden Therapeutikum verschiedener Hauterkrankungen. Der Vitamin D-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase der Haut, ist aber auch an der systemischen Calcium-Homöostase beteiligt. Die klinische Nutzung von 1,25D₃ war durch die hypercalcämischen Nebeneffekte stark eingeschränkt. Die Behandlung hyperproliferativer Störungen, wie Psoriasis, mit Vitamin D₃ kann auch in therapeutischer Dosierung zu Hypercalcämie führen. Aus diesem Grund wurden große Anstrengungen unternommen, um neue Vitamin D₃-Analoga zu entwickeln, die bei gleichen antiinflammatorischen Wirkungen keine oder nur geringe unerwünschte Nebeneffekte auf den Calcium-Haushalt aufweisen. Die Trennung dieser unterschiedlichen Aktivitäten wird durch die, mittels Modifizierungen der Seitenketten hervorgerufene, Veränderung der Affinität am Vitamin D-bindenden Protein (VDBP) bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst überprüft werden, ob die Wirkung dieser Vitamin D₃-Analoga tatsächlich *in vivo* antiinflammatorische Wirkungen zeigt und die Entzündungsreaktion der läsionalen Psoriasis-Haut drosselt. Hierfür wurden zusätzlich zu Biopsien unbehandelter betroffener Haut Proben entnommen, die zuvor mit Calcipotriol behandelt wurden. Dieses Vitamin D₃-Analogon wird seit vielen Jahren in der Therapie verwendet und zeigte auch in unseren Analysen gute Wirkung. Das klinische Bild der läsionalen Psoriasis-Haut zeigte eine deutliche Reduktion der Entzündungszeichen. Auch die Auswertung der mittels qRT-PCR gefundenen Werte ergab eine signifikante Reduktion der Entzündungsmediatoren wie IL-17A. IL-8 wird durch diese Behandlung ebenfalls reduziert (62). Diesbezüglich entsprechen die hier dargestellten Ergebnisse denen früherer Studien und der klinischen Erfahrung (103, 104, 112–114). In diesem Zusammenhang überraschend ist allerdings die Tatsache, dass die Cathelicidin-Expression nach der Behandlung noch höher ist als zuvor. Auch bei Anwendung anderer Methoden zum Nachweis der Cathelicidin-Expression, wie der Immunhistofärbung von Gewebeschnitten, zeigten sich die gleichen Ergebnisse: Nach der Calcipotriol-Behandlung wurde mehr Cathelicidin exprimiert als vorher. Zahlreiche Publikationen bewiesen mit ihren Ergebnissen den proinflammatorischen Charakter dieses AMP (59, 115). Doch seit einiger Zeit deuten immer mehr Indizien auf eine ebenfalls vorhandene antiinflammatorische Komponente hin (116–119). Diese Ergebnisse stammen allerdings aus Versuchen mit Neutrophilen, nicht jedoch von Keratinozyten. Ob die Zelltypen, die das LL-37 exprimierten, hierbei von Bedeutung für die Wirkung im entspre-

chenden Gewebe sind, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. In unseren Ergebnissen finden sich ebenfalls starke Indizien für eine antiinflammatorische Wirkung von Cathelicidin. Die ermittelten Psoriasin-Werte, einem anderen antimikrobiellen Peptid, veränderten sich hingegen unter der Therapie nicht signifikant.

Als weitere mögliche Erklärung für die Verbesserung des Krankheitsbildes ist ein Zusammenhang mit anderen biologischen Effekten der Analoga, beispielsweise auf die Differenzierung der Keratinozyten, denkbar (103).

4.3 Einfluss verschiedener Vitamin D3-Analoga auf die Expression antimikrobieller Peptide *in vitro*

Neben Calcipotriol wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Vitamin D3-Analoga entwickelt, die unterschiedliche Eigenschaften und Wirkungsstärken aufweisen. Sowohl die klinische Erfahrung im Rahmen der Psoriasis-therapie als auch die *in vivo*-Versuche in 3.1 zeigen deutliche entzündungshemmende Effekte. Um zu untersuchen, inwieweit die jeweiligen Substanzen auch tatsächlich der Cathelicidin-aktivierenden Wirkung von 1,25D3 entsprechen, wurden primäre humane epidermale Keratinozyten mit verschiedenen Vertretern dieser Gruppe stimuliert. Für eine Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden die einzelnen Analoga im Vergleich miteinander und mit 1,25D3 getestet. Durch die Transkriptionsmodulation diverser Gene mit VDRE in deren Promoterregion ergeben sich die Wirkungen der 1,25D3-Derivate, darunter auch die Hemmung epidermaler Proliferation und kutaner Entzündungsaspekte. Die Affinität zum VDBP im Serum dagegen ist bei diesen Substanzen gering bis überhaupt nicht ausgeprägt, sodass die unerwünschten Wirkungen auf den Calcium- und Phosphathaushalt kaum noch Probleme darstellen. Während bisherige Studien eine mit 1,25D3 vergleichbare Wirkungsstärke von Calcipotriol und ZK203278 andeuten, ergibt sich für ZK191784 und ZK159222 eher das Bild von partiellen Antagonisten (97, 103, 104, 106–108). Dieser Antagonismus kommt zustande, wenn beispielsweise ZK191784 mit 1,25D3 selbst um den VDR konkurriert (97). Im Falle von ZK159222 kommt es sogar zu einer Konformationsänderung der Heterodimere am VDR (107). Interaktionen mit Coaktivatorproteinen sind in diesen Fällen nicht mehr möglich (108). Ein partieller Antagonismus liegt in beiden Fällen vor, da bei alleiniger Stimulation mit ZK191784 bzw. ZK159222 auch agonistische Effekte, nämlich im getesteten Fall die Stimulation der Cathelicidin-Expression, im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten sind.

Was die Cathelicidin-Expression betraf, so bewirkten die getesteten Analoga in allen Versuchen ein ähnliches Expressionsmuster. Die Reporteranalyse zeigte eine

deutliche Steigerung der Cathelicidin-Promoteraktivität bei Stimulation mit Calcipotriol und ZK203278. Die Stimulationen mit ZK191784 und ZK159222 ergaben deutlich geringere Effekte. Die Steigerung der exprimierten Cathelicidin-mRNA nach der Stimulation mit 1,25D3 und dessen Analoga war begleitet von erhöhten Mengen des Cathelicidin-Vorläuferproteins hCAP18. Die im Western Blot nachgewiesene tatsächliche Ausschüttung des Vorläufer-Proteins hCAP18 entsprach weitestgehend den Wirkungsrelationen der unterschiedlichen Analoga, die bereits auf Gen- und mRNA-Ebene gezeigt wurden. 1,25D3 wurde bei allen Versuchen als Positivkontrolle mit dem stärksten Induktionseffekt eingesetzt. Calcipotriol, wie auch ZK203278, wirkten nur wenig schwächer. Auf Proteinebene induzierte letzteres die hCAP18-Ausschüttung leicht stärker als Calcipotriol und 1,25D3 selbst. Die Abweichung war jedoch gering. ZK191784 hatte nur wenig induzierende Wirkung und ZK159222 zeigte erwartungsgemäß die kleinsten Effekte. Die Wirksamkeit der getesteten Substanzen war deutlich zeit- und dosisabhängig, was entsprechend bei der therapeutischen Nutzung berücksichtigt werden muss.

Im experimentellen System der durchgeführten Studien wurden hauptsächlich die Veränderungen der hCAP18- bzw. LL-37-Expression infolge diverser Stimulationen ermittelt. Hierbei konnte mit Hilfe von Western Blots allerdings nur die Form des Vorläuferproteins hCAP18 mit erhöhten Werten nachgewiesen werden, nicht jedoch das aktive LL-37-Peptid. Da die eingesetzten Primer bei der Nachweismethode der RT-PCR die mRNA, also das Signal zur erhöhten Produktion von hCAP18 nachweist, kann auch mit dieser Technik nicht geprüft werden, ob das Vorläuferprotein letztendlich auch zu LL-37 weiter prozessiert wird. Eine klare Aussage, ob hCAP18 oder tatsächlich LL-37 erhöht waren, kann so nicht getroffen werden.

Die Prozessierung von hCAP18 zu aktivem LL-37 wird in der Haut von Serinproteasen der Kallikrein-Familie vermittelt (26). In den durchgeführten Experimenten konnten keine erhöhten Werte des aktiven LL-37-Peptids festgestellt werden. Diese Tatsache kann entweder durch sehr niedrige und damit nicht detektierbare Peptid-Level im experimentellen System erklärt werden, oder durch die Tatsache, dass zur Prozessierung von hCAP18 notwendige Faktoren nicht vorhanden waren. Die Cathelicidin-Expression und LL-37-Ausschüttung steigen nach Hautverletzungen und bakteriellen Infektionen rapide an. Das sind Situationen, in denen das Gewebe der Haut durchbrochen wird und die notwendigen Proteasen freigesetzt werden (66, 79). In psoriatischer Haut liegt ein sehr hoher Turnover der Keratinozyten vor. Die sterbenden Zellen setzen eine Reihe von Proteasen frei, die dann die Prozessierung von hCAP18 zu LL-37 ermöglichen. LL-37 bildet anschließend Komplexe mit der körpereigenen DNA, die dann die autoentzündliche Kaskade in Gang setzt (37). So werden plasmazytoide dendritische Zel-

len (pDCs) aktiviert, die IFN- α ausschütten (37). Nach der Behandlung psoriatischer Haut mit Calcipotriol war IFN- α allerdings nicht erhöht (Peric et al., unveröffentlichte Daten). Möglicherweise ist die Induktion von hCAP18 nicht gleichzusetzen mit einer Induktion des aktiven LL-37-Peptids. Dies ließe sich mit einem Mangel an Faktoren erklären, die in die Prozessierung von hCAP18 involviert sind. Zukünftige Studien werden sich noch mit der Klärung dieser Prozessierungswege und deren Steuerung beschäftigen müssen.

4.4 Signaltransduktionsmechanismus der Vitamin D3-Analoga

Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle Analoga die Cathelicidin-Expression induzieren, wurde der zugrunde liegende Signalweg näher beleuchtet. Die Vermittlung eines Großteils der biologischen Effekte von 1,25D3, darunter auch die Induktion der Cathelicidin-Expression, erfolgt über den Vitamin D-Rezeptor (30). Nach Bindung eines Liganden werden Heterodimere gebildet, die anschließend innerhalb der Promoterregion entsprechend reagierender Gene am VDRE binden. Nun kann gegebenenfalls eine Vielzahl nukleärer Coaktivator-Proteine zum Einsatz kommen und die auszulösende Reaktion modulieren. Die bereits in einigen Studien belegte Wirkung von Vitamin D3-Analoga über den VDR konnten wir für alle getesteten Substanzen bestätigen (120). Durch gezielte Blockade des VDR mittels siRNA zeigte sich eine deutlich reduzierte Stimulation der Cathelicidin-Expression. Diese Ergebnisse fanden sich sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene. Lediglich ZK159222 wurde aufgrund der ohnehin sehr geringen Effekte und seiner Wirkung als partieller Antagonist nicht diesbezüglich getestet. Es ist jedoch davon auszugehen, dass hier der gleiche Signalmechanismus vorliegt.

In vergangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass der MEK/ERK-Signalweg, insbesondere die Kinasen MEK, ERK1 und ERK2, an der Vitamin D3-induzierten Cathelicidin-Expression beteiligt ist (12, 22). Diese nach Stimulation mit 1,25D3 in den Zellen aktivierte Signalkaskade ist ebenfalls an der Cathelicidin-Induktion durch die hier getesteten Vitamin D3-Analoga beteiligt. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von MEK/ERK durch spezifische Inhibitoren die Cathelicidin-Expression blockiert. So ergab die Stimulation der NHEK mit den verschiedenen Analoga unter dem Einfluss des spezifischen MEK-1-Inhibitors PD98059 deutlich reduzierte Cathelicidin-Expressionswerte auf mRNA-Ebene. Auch ERK1 und -2 wurden in weiteren Experimenten über RNA-Interferenz herunterreguliert. So konnte ebenfalls durch entsprechend geringere Cathelicidin-Expression nach Stimulation mit 1,25D3 selbst und dessen Analoga die Beteiligung des MEK/ERK-Signalwegs bewiesen werden.

4.5 Wirkung von IL-17A auf die Induktion der Cathelicidin-Expression durch Vitamin D3-Analoga

Frühere Studien haben sich bereits mit der Rolle von Th17-Zytokinen im Rahmen der kutanen Entzündungsreaktion bei Psoriasis beschäftigt (12, 121). Proinflammatorische Zytokine wie IL-17A sind Effektormoleküle, die von Th17-Zellen gebildet werden. Proben läsionaler Haut von Psoriasispatienten enthalten große Mengen von Th17-Zellen und den entsprechenden Zytokinen (121). Wie bereits in 3.1 gezeigt, sind die Werte von IL-17A ebenfalls entsprechend erhöht. Diese Daten und die Ergebnisse weiterer Untersuchungen (122) lassen darauf schließen, dass der Th17-Signalweg für die Kontrolle der angeborenen Abwehr der Haut und die Pathogenese der Psoriasis von entscheidender Bedeutung ist. IL-17A wird als Homodimer sezerniert und aktiviert seinen Rezeptor, welcher zur erhöhten Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine, wie beispielsweise IL-8, TNF- α und IL-1 β , in den Zielzellen führt (110). Berücksichtigt man die Tatsache, dass IL-17A ein für Hautentzündungen charakteristischer Marker und zusätzlich in erhöhten Mengen in den läsionalen Keratinozyten vorhanden ist, stellt sich die Frage, welchen Einfluss dieses Zytokin selbst auf die in Psoriasis-Haut ohnehin bereits erhöhte Cathelicidin-Expression hat. Um dies zu untersuchen, wurden *in vitro*-Versuche durchgeführt, in denen NHEK mit IL-17A, 1,25D3, einem Analogon und deren Kombinationen stimuliert wurden. Wie Peric et al. bereits zeigten, hatte IL-17A allein dabei keinen Effekt auf die Cathelicidin-Expression. In Anwesenheit von 1,25D3 bzw. ZK191784 erhöhte es jedoch deren entsprechende Wirkung (12). Der genaue Zusammenhang zwischen dem Vitamin D3- und dem IL-17A-Signalweg bedarf noch weiterer Untersuchungen. Geklärt ist jedoch, dass IL-17A nicht die durch Vitamin D3 angeregten Prozesse beeinflusst, die zu einer Erhöhung der Cathelicidin-Expression führen, wie beispielsweise die Aktivierung von 1,25D3 durch CYP27B1 oder die gesteigerte Acetylierung von Histonen (12, 29, 30, 79, 123).

4.6 Vitamin D3-Analoga als mögliche Therapeutika

Die antiinflammatorische Wirkung von Calcipotriol ist bereits seit vielen Jahren bekannt und wird umfangreich genutzt. Ähnliche Erfolge könnten in Zukunft auch mit anderen 1,25D3-Analoga erzielt werden.

Alle hier getesteten Analoga induzierten, wie 1,25D3 selbst, die Cathelicidin-Expression über den VDR und den MEK/ERK-Signalweg. Dieser Effekt könnte ebenso bei der Therapie anderer Hautkrankheiten, wie der atopischen Dermatitis, genutzt werden. Bereits belegt ist, dass oral verabreichtes 1,25D3 die Cathelicidin-Produktion in Patienten mit atopischer Dermatitis steigert (124). Eine Behandlung mit Vitamin D3-

Analoga, die weniger calcämische Nebenwirkungen zeigen, könnte so helfen, diese Patienten vor mikrobiellen Superinfektionen zu schützen.

5 Zusammenfassung

Der menschliche Körper ist in seiner Gesamtheit permanent schädlichen Einflüssen von außen ausgesetzt, darunter diverse Umwelteinflüsse, Mikroorganismen und vieles mehr. Ein sehr komplexes Abwehrsystem, an dem verschiedenste Organe beteiligt sind, ist notwendig, um ihn vor diesen Angriffen zu schützen. Beispielsweise bildet die Haut eine äußere Barriere, die den Organismus abschirmen und ggf. Abwehrvorgänge einleiten soll. Zu diesem Zweck reagiert sie empfindlich auf Störungen, wie Verletzungen oder mikrobielle Infektionen. Ein Bestandteil der in diesen Fällen eingeleiteten Abwehrmaßnahmen sind die antimikrobiellen Peptide (AMP), wie Defensine und Cathelicidine. Das einzige humane Cathelicidogen codiert für das Peptid LL-37, das aus dem Vorläuferprotein hCAP18 prozessiert wird. Neben der weit gefächerten antimikrobiellen Aktivität weist es noch eine Reihe anderer wichtiger Funktionen auf. Die vielfältigen Fähigkeiten der AMP, als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems zu wirken, die Chemokin- und Zytokinproduktion, sowie die Genexpression im Sinne notwendiger Abwehrprozesse zu steuern, werden unter dem Begriff „Alarmin“ zusammengefasst (6).

Die Expression des Cathelicidin-Peptids LL-37 erfolgt in gesunder Haut nur in sehr geringen Mengen. In läsionaler Haut von Psoriasispatienten zeigt sich jedoch eine starke Expression. Seit Längerem bestand deshalb bereits die Vermutung, Cathelicidin spiele eine Rolle in der Pathogenese der, mit einer Erkrankungsrate von 2% der Menschen weltweit, recht häufigen Hautkrankheit Psoriasis. In psoriatischen Läsionen finden sich große Mengen des AMP LL-37. Die Pathogenese wurde inzwischen soweit aufgeklärt, dass man einen autoimmunen Mechanismus annimmt, der die Komplexbildung von LL-37 mit körpereigener DNA am Anfang einer Immunkaskade sieht. Über einige Aktivierungsschritte mit Beteiligung plasmazytoider dendritischer Zellen kommt ein Circulus vitiosus in Gang, der für noch mehr LL-37 und noch mehr Entzündung der Haut sorgt (37). Eine zusätzliche Reizung der Haut, zum Beispiel durch eine Verletzung, triggert diesen Mechanismus, wie das Köbner-Phänomen deutlich zeigt. Außerdem hemmt Cathelicidin die Apoptose in Keratinozyten, was ebenfalls zu deren verändertem Phänotyp in Psoriasisläsionen beiträgt (63). AMP agieren als „Alarmine“, die die angeborenen mit den adaptiven Immunantworten verbinden (6, 37, 125). Da AMP direkt in die Psoriasispathogenese involviert sind, ergibt sich hier die Möglichkeit eines Therapieansatzes (37).

In der Behandlung von Psoriasis werden seit langer Zeit Vitamin D3 und dessen Analoga, wie Calcipotriol, mit Erfolg eingesetzt. Der Mechanismus dieser Therapie ist jedoch bis heute nicht vollständig geklärt. Besonders widersprüchlich erscheint dabei die Tatsache, dass erhöhte Cathelicidin-Mengen einen Faktor des proinflammatorischen Teufelskreises der Psoriasis-Pathogenese ausmachen, während eine Steigerung der Cathelicidin-Expression im Rahmen der Therapie deutliche antiinflammatorische Wirkungen zeigt. Bekannt ist, dass 1,25D3 ein sehr wirkungsvolles Therapeutikum ist, die Nebenwirkungen auf den Calcium- und Phosphathaushalt den klinischen Gebrauch aber stark einschränken. Daher wurden Analoga entwickelt, die ein spezifischeres Wirkprofil aufweisen. Die Behandlung mit diesen Substanzen zeigte in der Vergangenheit gute Ergebnisse, was das klinische Bild der läsionalen Haut betraf. Auch in unseren Analysen der entnommenen Hautproben konnten wir eine Reduktion der Entzündung feststellen. Die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine war deutlich herunter reguliert. Cathelicidin stieg jedoch unter der Behandlung weiter an. Die Untersuchung der Effekte verschiedener Vitamin D3-Analoga auf die Cathelicidin-Expression *in vitro* zeigte ebenfalls signifikante und reproduzierbare Ergebnisse, sowohl auf Gen- und mRNA-, als auch auf Proteinebene: Alle getesteten Analoga erhöhten die Cathelicidin-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle, wobei Calcipotriol und ZK203278 die stärksten Effekte zeigten. ZK191784 und ZK159222 wiesen eine partiell antagonistische Wirkung auf. Aus allen Analysen leitete sich sowohl eine deutliche Zeit-, als auch Dosisabhängigkeit ab.

Die Untersuchung der beteiligten Signalwege ergab die Beteiligung des Vitamin D Rezeptors (VDR) und der Kinasen MEK und ERK, das heißt die Analoga wirken in gleicher Weise wie 1,25D3 selbst.

IL-17A ist ein charakteristischer proinflammatorischer Marker für Entzündungen der Haut. In läsionaler Haut von Psoriasispatienten sind erhöhte Mengen dieses Interleukins vorhanden. In den durchgeführten *in vitro*-Versuchen konnte durch kombinierte Stimulationen der Keratinozyten gezeigt werden, dass IL-17A allein keinen Effekt auf die Cathelicidin-Expression hat. In Verbindung mit 1,25D3 oder dessen Analoga wurde die Expression allerdings noch zusätzlich gesteigert. Der genaue Mechanismus dieser Effekte muss jedoch in Zukunft noch weiter aufgeklärt werden.

Diese Arbeit bietet Einblicke in die Wirkungsweise neuer, vielversprechender Therapeutika und deren Möglichkeiten bezüglich des Einflusses auf die Cathelicidin-Expression. Die vermutete Hochregulation der Cathelicidin-Produktion durch Behandlung mit Vitamin D3-Analoga konnten wir bestätigen. Hier zeigen sich starke Hinweise für die noch wenig bewiesenen Theorien bezüglich der antiinflammatorischen Wirkungen von Cathelicidin. Die Annahme, es wirke ausschließlich proinflammatorisch, muss

zunehmend revidiert bzw. in engem Zusammenhang mit den zellulären Gegebenheiten und dem Mikromilieu betrachtet werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

AMP: Antimikrobielle Peptide

APAAP: Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase

bp: Basenpaare

BCA: bicinchoninic acid

BSA: Bovine Serum Albumin

C: Kohlenstoff

ca.: circa

Ca: Calcium

CAMP: Cathelicidin antimicrobial peptide

cDNA: complementary DNA

cm²: Quadratzentimeter

CO₂: Kohlenstoffdioxid

CD4/CD14: cluster of differentiation 4/14

CYP24A1 entspricht der Vitamin D-24-Hydroxylase

CYP27A1 entspricht der Vitamin D-25-Hydroxylase

CYP27B1 entspricht der 1- α -Hydroxylase

°C: Grad Celsius

DEPC: Diäthylpyrokarbonat

DNA: desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure

DMEM: Dulbecco`s modified Eagle` medium

ECL: Elektrochemilumineszenz

E.coli: Escherichia coli

EDGS: defined growth supplement

EDTA: ethylenediaminetetraacetate

ERK: extracellular signal regulated protein kinase

FBS: fötales Kälberserum

g: Gramm

ggf.: gegebenenfalls

h: hour / Stunde

HaCaT: Human adult low Calcium high Temperature

hBD: humane β Defensine

hCAP: human Cathelicidin Protein

HLA: Haupthistokompatibilitätskomplex

HRP: Horseradish Peroxidase

IFN: Interferon

IgE: Immunglobulin E

IL: Interleukin

kb: Kilobasen

kDa: Kilodalton

kg: Kilogramm

KG: Körpergewicht

l: Liter

LDS: Lithium Dodecyl Sulfate

LL-37: humanes antimikrobielles Peptid zur Familie der Cathelicidine gehörend

LPS: Lipopolysaccharid

IU: international units/ internationale Einheit

μ g: Mikrogramm

μ l: Mikroliter

M: Molar

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEK: MAP-ERK kinase 1/2

MES: medium size

min: Minute

ml: Milliliter

mm: Millimeter

mM: Millimolar

MEK: extracellular regulated kinase

mmol/24h: Millimol pro 24 Stunden

mRNA: messenger Ribonukleinsäure

n: Anzahl

NaCl: Natriumchlorid/Kochsalz

NF- κ B: nuclear factor kappa von aktivierten B-Zellen

NHEK: normal human epidermal Keratinocyte / primäre humane epidermale Keratinozyten

ng: Nanogramm

NK- Zellen: natural killer-Zellen

nm: Nanometer

nM: Nanomolar

n.s.: nicht signifikant

o.g.: oben genannt

OH: Hydroxylgruppe

PBGD: Porphobilinogen Deaminase

PBS: phosphat buffered saline

PCR: polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion

pDC: plasmazytoide dendritische Zellen

pH: Potentia hydrogenii / Wasserstoffionenkonzentration

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

PMN: polymorphonuclear cell / polymorphkernige Granulozyten

PUVA: Psoralen plus UV-A

PVDF: Polyvinylidene Fluoride

p38 MAPK: 38 kDa mitogen-aktivierte Protein-Kinase

qRT-PCR : quantitative real time polymerase chain reaction

RIPA-Buffer: Radio Immuno Precipitation Assay Buffer

RNA: ribonuclein acid/ Ribonukleinsäure

RT: reverse transcription

RXR: Retinoid-X-Rezeptor

S100A7: Psoriasin

SDS: Sodium Dodecylsulfat

sek: Sekunde

siRNA: short interfering RNA

Tab.: Tabelle

TBS: Tris buffered saline

TBST: Tris buffered saline tween

Th1/Th2/Th17: T-Helfer-Zellen vom Typ 1/2/17

TNF: Tumornekrosefaktor

TLR: Toll like Rezeptor

U: units

UK: United Kingdom

U/min: Umdrehungen pro Minute

USA: United States of America/vereinigte Staaten von Amerika

UV: Ultraviolettstrahlung

UVA: Ultraviolettstrahlung Typ A im Wellenlängenbereich von 315 bis 380 nm

UVB: Ultraviolettstrahlung Typ B im Wellenlängenbereich von 280 bis 315 nm

V: Volt

VDBP: Vitamin D bindendes Protein

VDR: Vitamin D-Rezeptor

VDRE: Vitamin D responsive Element

vs.: versus

z.B.: zum Beispiel

1,25D3: 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol

25D3: 25-Hydroxy-Cholecalciferol

7 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Antimikrobielle Funktion der AMP	10
Abbildung 2: Verschiedene Funktionen antimikrobieller Peptide im Rahmen der Immunabwehr	11
Abbildung 3: Darstellung des Beginns und der Aufrechterhaltung der durch LL-37 entfachten autoimmunen Entzündungsreaktion in der Haut von Psoriasispatienten	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vitamin D3-Synthese in den entsprechend beteiligten Organsystemen	24
Abbildung 5: Struktur von 1,25D3 und seinen Analoga Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222	27
Abbildung 6: Paraffinschnitte von Psoriasispatienten entnommen aus psoriatischen Plaques	41
Abbildung 7: Expression antimikrobieller Peptide und IL-17A in gesunder Haut und nicht behandelter läsionaler Haut von Psoriasispatienten	42
Abbildung 8: Expression antimikrobieller Peptide und IL-17A vor und nach der Behandlung mit dem Vitamin D3-Analogon Calcipotriol	43
Abbildung 9: Immunhistofluoreszenz von Gefrierschnitten, entnommen aus psoriatischen Läsionen vor und nach Calcipotriol-Behandlung	44
Abbildung 10: Reporteragen-Analyse zur Ermittlung der Cathelicidin-Promoter-Aktivität nach Stimulation mit 1,25D3, Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222	45
Abbildung 11: qRT-PCR Analysen der Cathelicidin-Expression von mit Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222 stimulierten NHEK - Dosisabhängigkeit	46
Abbildung 12: qRT-PCR Analysen der Cathelicidin-Expression von mit Calcipotriol und ZK191784 stimulierten NHEK - Zeitabhängigkeit	47

Abbildung 13:	Western Blot Analysen der hCAP18-Expression von mit Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222 stimulierten NHEK	48
Abbildung 14:	Kontrolle des Effektes der VDR-siRNA auf die Transkription des Vitamin D-Rezeptors	49
Abbildung 15:	qRT-PCR Analysen der Cathelicidin-Expression von mit VDR-siRNA transfizierten und mit Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 stimulierten NHEK	50
Abbildung 16:	Western Blot Analysen der mit Kontroll- und VDR-siRNA transfizierten und mit Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 stimulierten NHEK	51
Abbildung 17:	qRT-PCR Analysen der Cathelicidin-Expression von NHEK nach Inkubation mit dem spezifischen MEK1-Inhibitor PD98059 und anschließender Stimulation mit Calcipotriol, ZK191784, ZK203278 und ZK159222	52
Abbildung 18:	qRT-PCR Analysen zur Kontrolle der Herunterregulation der Kinasen ERK1 und ERK2	52
Abbildung 19:	qRT-PCR Analyse der Cathelicidin-Expression von mit ERK1/2-siRNA transfizierten und mit Calcipotriol, ZK191784 und ZK203278 stimulierten NHEK	53
Abbildung 20:	qRT-PCR Analysen der Cathelicidin-Expression von mit 1,25D3, ZK191784 und IL-17A stimulierten Keratinozyten	54
Tabelle 1:	Beispiele lokaler Therapeutika der Psoriasisstherapie, deren Wirkmechanismen, sowie mögliche, mit deren Anwendung verbundene Probleme	21
Tabelle 2:	Sequenzen der zur qRT-PCR verwendeten Primer	36

8 Literaturverzeichnis

1. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* 1996;**238**:325-332.
2. Braff MH, Gallo RL. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006;**306**:91-110.
3. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 2000;**1**:141-150.
4. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;**30**:131-141.
5. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;**3**:238-250.
6. Oppenheim JJ, Tewary P, La Rosa G de, de Yang. Alarmins initiate host defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;**601**:185-194.
7. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* 1999;**67**:6084-6089.
8. Nakajima Y, Qu XM, Natori S. Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.* 1987;**262**:1665-1669.
9. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;**415**:389-395.
10. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1999;**1462**:1-10.
11. Sørensen O, Bratt T, Johnsen AH, Madsen MT, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J. Biol. Chem.* 1999;**274**:22445-22451.
12. Peric m, Koglin S, Kim S, Morizane S, Besch R, Prinz JC et al. IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes. *J. Immunol.* 2008;**181**:8504-8512.
13. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J. Invest. Dermatol.* 2003;**120**:810-816.
14. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000;**8**:402-410.
15. Sorensen OE, Borregaard N. Cathelicidins--nature's attempt at combinatorial chemistry. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2005;**8**:273-280.
16. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1998;**9**:399-414.
17. Sørensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J. Immunol. Methods* 1997;**206**:53-59.
18. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;**95**:9541-9546.
19. Malm J, Sørensen O, Persson T, Frohm-Nilsson M, Johansson B, Bjartell A et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* 2000;**68**:4297-4302.

20. Murakami M, Dorschner RA, Stern LJ, Lin KH, Gallo RL. Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatr. Res.* 2005;**57**:10-15.
21. Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J. Immunol.* 2004;**172**:3070-3077.
22. Schaubert J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* 2006;**118**:509-519.
23. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2004;**75**:39-48.
24. Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Current issues in molecular biology* 2005;**7**:179-196.
25. Murakami M. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. *Blood* 2001;**97**:297-304.
26. Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM et al. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J.* 2006;**20**:2068-2080.
27. Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* 1997;**90**:2796-2803.
28. Wang T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* 2004;**173**:2909-2912.
29. Schaubert J, Iffland K, Frisch S, Kudlich T, Schmausser B, Eck M et al. Histone deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells. *Mol. Immunol.* 2004;**41**:847-854.
30. Schaubert J, Oda Y, Büchau AS, Yun Q, Steinmeyer A, Zügel U et al. Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Invest. Dermatol.* 2008;**128**:816-824.
31. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J.* 2005;**19**:1067-1077.
32. Weber G, Heilborn JD, Chamorro Jimenez CI, Hammarsjo A, Törmä H, Stahle M. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 2005;**124**:1080-1082.
33. Kida Y, Shimizu T, Kuwano K. Sodium butyrate up-regulates cathelicidin gene expression via activator protein-1 and histone acetylation at the promoter region in a human lung epithelial cell line, EBC-1. *Mol. Immunol.* 2006;**43**:1972-1981.
34. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;**96**:3086-3093.
35. Schaubert J, Gallo RL. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2007;**127**:510-512.
36. Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DME, Pistolic J, Li Y et al. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J. Immunol.* 2007;**179**:7684-7691.
37. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y, Homey B et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;**449**:564-569.
38. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 1991;**64**:229-230.
39. Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med.* 2002;**80**:549-561.

40. Harder J, Schröder J. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J. Leukoc. Biol.* 2005;**77**:476-486.
41. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;**3**:710-720.
42. Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder J. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J. Invest. Dermatol.* 2004;**123**:522-529.
43. Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J. Immunol.* 2003;**171**:3262-3269.
44. García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 2001;**306**:257-264.
45. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J. Immunol.* 2005;**175**:1776-1784.
46. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 1988;**263**:7472-7477.
47. vanderSpek JC, Offner GD, Troxler RF, Oppenheim FG. Molecular cloning of human submandibular histatins. *Arch. Oral Biol.* 1990;**35**:137-143.
48. vanderSpek JC, Wyandt HE, Skare JC, Milunsky A, Oppenheim FG, Troxler RF. Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 1989;**45**:381-387.
49. Schitteck B, Paulmann M, Senyürek I, Steffen H. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infectious disorders drug targets* 2008;**8**:135-143.
50. Gläser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J et al. The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 2009;**129**:641-649.
51. Jinquan T, Vorum H, Larsen CG, Madsen P, Rasmussen HH, Gesser B et al. Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J. Invest. Dermatol.* 1996;**107**:5-10.
52. Moll I, Augustin M, Jung EG. *Dermatologie ; 119 Tabellen*. Stuttgart, 2005. <http://www.thieme.de/ebooklibrary/inhalte/3131266864/index.html> / <http://www.gbv.de/dms/hebis-mainz/toc/133802507.pdf>.
53. Hengge UR, Ruzicka T. *Lehrbuch der Dermatologie und Venerologie. Ihr roter Faden durchs Studium nach der neuen ÄAppO ; mit 75 Tabellen sowie auf einer beiliegenden CD zusätzliches Bildmaterial und weiter gehende Informationen*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2006.
54. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 2002;**347**:1151-1160.
55. Harder J, Dressel S, Wittersheim M, Cordes J, Meyer-Hoffert U, Mrowietz U et al. Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J. Invest. Dermatol.* 2010;**130**:1355-1364.
56. Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, Jones JF, Wong C, Streib JE et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 2006;**24**:341-348.
57. Howell MD, Wollenberg A, Gallo RL, Flaig M, Streib JE, Wong C et al. Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;**117**:836-841.

58. Braun-Falco O, Burgdorf WHC, Landthaler M, Plewig G, Wolff HH. *Dermatologie und Venerologie*. Berlin, Heidelberg, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/b137790> / <http://www.gbv.de/dms/hebis-darmstadt/toc/126030855.pdf>.
59. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat. Med.* 2007;**13**:975-980.
60. Schaubert J, Gallo RL. The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response. *Exp. Dermatol.* 2008;**17**:633-639.
61. Fritsch P. *Dermatologie, Venerologie. Grundlagen - Klinik - Atlas ; mit 268 Tabellen*. Berlin: Springer, 2004.
62. Peric M, Koglin S, Dombrowski Y, Gross K, Bradac E, Büchau A et al. Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis. *PLoS ONE* 2009;**4**:e6340.
63. Chamorro CI, Weber G, Grönberg A, Pivarcsi A, Stähle M. The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2009;**129**:937-944.
64. Chen Y, Thai P, Zhao Y, Ho Y, DeSouza MM, Wu R. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 2003;**278**:17036-17043.
65. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J. Exp. Med.* 2004;**199**:731-736.
66. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J. Invest. Dermatol.* 2001;**117**:91-97.
67. Baker BS, Brown DW, Fischetti VA, Ovigne JM, Porter W, Powles A et al. Skin T cell proliferative response to M protein and other cell wall and membrane proteins of group A streptococci in chronic plaque psoriasis. *Clin. Exp. Immunol.* 2001;**124**:516-521.
68. Baker BS, Laman JD, Powles A, van der Fits L, Voerman JSA, Melief M et al. Peptidoglycan and peptidoglycan-specific Th1 cells in psoriatic skin lesions. *J. Pathol.* 2006;**209**:174-181.
69. Tjabringa G, Bergers M, van Rens D, Boer R de, Lamme E, Schalkwijk J. Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *Am. J. Pathol.* 2008;**173**:815-823.
70. Lehmann B, Genehr T, Knuschke P, Pietzsch J, Meurer M. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in an in vitro human skin equivalent model. *J. Invest. Dermatol.* 2001;**117**:1179-1185.
71. Bikle DD. What is new in vitamin D: 2006-2007. *Curr Opin Rheumatol* 2007;**19**:383-388.
72. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Exp. Dermatol.* 2007;**16**:618-625.
73. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;**79**:362-371.
74. Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J. Cell. Biochem.* 2003;**88**:259-266.
75. Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* 2005;**85**:373-422.
76. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.* 2004;**29**:664-673.
77. Bikle DD, Pillai S, Gee E, Hincenbergs M. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in human keratinocytes by interferon-gamma. *Endocrinology* 1989;**124**:655-660.
78. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J. Cell. Biochem.* 2004;**92**:436-444.

79. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 2007;**117**:803-811.
80. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;**311**:1770-1773.
81. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* 1998;**13**:325-349.
82. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin. Chim. Acta* 2006;**371**:1-12.
83. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005;**97**:93-101.
84. Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;**67**:545-579.
85. Saunders N, Dicker A, Popa C, Jones S, Dahler A. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res.* 1999;**59**:399-404.
86. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002;**8**:174-179.
87. Bikle DD. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2008;**17**:348-352.
88. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 2000;**120**:139-146.
89. Xie Z, Munson SJ, Huang N, Portale AA, Miller WL, Bikle DD. The mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) autoregulation in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**:36987-36990.
90. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2003;**170**:5382-5390.
91. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E et al. Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2000;**164**:4443-4451.
92. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J. Immunol.* 2001;**167**:4974-4980.
93. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J. Clin. Invest.* 1998;**101**:252-262.
94. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* 2000;**164**:2405-2411.
95. van Halteren AGS, van Etten E, Jong EC de, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes* 2002;**51**:2119-2125.
96. Lebwohl M, Menter A, Koo J, Feldman SR. Combination therapy to treat moderate to severe psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2004;**50**:416-430.
97. Zügel U, Steinmeyer A, Giesen C, Asadullah K. A novel immunosuppressive 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ analog with reduced hypercalcemic activity. *J. Invest. Dermatol.* 2002;**119**:1434-1442.
98. Hewison M. Vitamin D and the immune system. *J. Endocrinol.* 1992;**132**:173-175.
99. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 2000;**342**:1478-1483.

100. Slatopolsky E, Brown AJ. Vitamin D analogs for the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Blood Purif.* 2002;**20**:109-112.
101. Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Nishii Y. Protein-binding properties of 22-oxa-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, a synthetic analogue of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1989;**35**:529-533.
102. Boehm MF, Fitzgerald P, Zou A, Elgort MG, Bischoff ED, Mere L et al. Novel non-secosteroidal vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Chem. Biol.* 1999;**6**:265-275.
103. Scott LJ, Dunn CJ, Goa KL. Calcipotriol ointment. A review of its use in the management of psoriasis. *Am J Clin Dermatol* 2001;**2**:95-120.
104. Guilhou JJ. [Calcipotriol]. *Ann Dermatol Venereol* 2001;**128**:229-237.
105. Bourke JF, Berth-Jones J, Hutchinson PE. Hypercalcaemia with topical calcipotriol. *BMJ* 1993;**306**:1344-1345.
106. Nijenhuis T, van der Eerden BCJ, Zügel U, Steinmeyer A, Weinans H, Hoenderop JGJ et al. The novel vitamin D analog ZK191784 as an intestine-specific vitamin D antagonist. *FASEB J.* 2006;**20**:2171-2173.
107. Toell A. Carboxylic ester antagonists of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) show cell-specific actions. *Chem. Biol.* 2000;**7**:885-894.
108. Herdick M, Steinmeyer A, Carlberg C. Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 is mediated by a lack of ligand-induced vitamin D receptor interaction with coactivators. *J. Biol. Chem.* 2000;**275**:16506-16512.
109. Toell A, Gonzalez MM, Ruf D, Steinmeyer A, Ishizuka S, Carlberg C. Different molecular mechanisms of vitamin D(3) receptor antagonists. *Mol. Pharmacol.* 2001;**59**:1478-1485.
110. van Beelen AJ, Teunissen MBM, Kapsenberg ML, Jong EC de. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;**7**:374-381.
111. Nickoloff BJ, Qin J, Nestle FO. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2007;**33**:45-56.
112. Bourke JF, Mumford R, Whittaker P, Iqbal SJ, Le Van LW, Trevelyan A et al. The effects of topical calcipotriol on systemic calcium homeostasis in patients with chronic plaque psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1997;**37**:929-934.
113. Duweb G, Alhaddar J, Abuhamida M. Calcipotriol solution in scalp psoriasis. *Int J Tissue React* 2005;**27**:163-166.
114. Charakida A, Dadzie O, Teixeira F, Charakida M, Evangelou G, Chu AC. Calcipotriol/betamethasone dipropionate for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Pharmacother* 2006;**7**:597-606.
115. Braff MH, Hawkins MA, Di Nardo A, Lopez-Garcia B, Howell MD, Wong C et al. Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *J. Immunol.* 2005;**174**:4271-4278.
116. Alalwani MS, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C et al. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European journal of immunology* 2010.
117. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, Doria S, Falsafi R, Hokamp K et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol.* 2006;**176**:2455-2464.
118. Mookherjee N, Wilson HL, Doria S, Popowych Y, Falsafi R, Yu JJ et al. Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* 2006;**80**:1563-1574.
119. Morioka Y, Yamasaki K, Leung D, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides inhibit hyaluronan-induced cytokine release and modulate chronic allergic dermatitis. *J. Immunol.* 2008;**181**:3915-3922.
120. Pinette KV, Yee YK, Amegadzie BY, Nagpal S. Vitamin D receptor as a drug discovery target. *Mini Rev Med Chem* 2003;**3**:193-204.

121. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 2007;**8**:950-957.
122. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard F et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 2007;**150**:407-415.
123. Schaubert J, Svanholm C, Termén S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W et al. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003;**52**:735-741.
124. Hata TR, Kotal P, Jackson M, Nguyen M, Paik A, Udall D et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;**122**:829-831.
125. Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;**122**:261-266.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. med. Jürgen Schauber für die Möglichkeit danken, dieses Thema in den entsprechenden Räumlichkeiten mit den zur Verfügung gestellten Geräten und Materialien und seiner Unterstützung bearbeiten zu dürfen. Er begleitete mich mit seinem Wissen, seinen Ideen und seiner Kritik durch meine praktische und theoretische Arbeit.

Ich bedanke mich ebenfalls herzlich bei Dr. Yvonne Dombrowski, Dr. Mark Peric und Sarah Koglin für die fantastische Betreuung, denn Sie brachten mir sehr viel Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Verlobten Mario richten, der mich jederzeit nach Kräften unterstützt, motiviert und aufgebaut hat. Er hat getröstet bei Misserfolgen, das Gelingen der Versuche und Fortschritte der Arbeit mit gefeiert und war einfach immer da.

Danke sage ich auch meinem Sohn Colin, der mir seit seiner Geburt jeden Tag erhellt und so die Fertigstellung dieser Arbeit erleichtert hat. Auch die ruhigen Nächte in Vorbereitung der mündlichen Prüfung waren sehr hilfreich.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die Ermöglichung meines Studiums, die finanzielle, moralische und immer tatkräftige Unterstützung dabei und in allen anderen beruflichen und privaten Bereichen, wann immer ich sie brauchte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Thomas Mocker, der mir jederzeit, besonders in Computerfragen, aber auch mit Ideen und Kritik helfend zur Seite stand.

Ich danke meiner gesamten Familie und meinen Freunden für Motivation, Geduld, Hilfe und Abwechslung, wenn ich sie dringend nötig hatte.