

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

Zytosolische DNA aktiviert das AIM2-Inflammasom in Keratinocyten bei Psoriasis

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

vorgelegt von
Christine Erika Göß
aus Rothenburg o. d. Tauber

2013

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Jürgen Schauber
Mitberichterstatter:	PD Dr. Marianne Placzek, Prof. Dr. Christian Sommerhoff
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Yvonne Dombrowski, PD Dr. rer. hum. biol. R. Besch
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2013

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Psoriasis	7
1.2	Antimikrobielle Peptide	10
1.2.1	Cathelicidin	12
1.2.2	Cathelicidin und Psoriasis	14
1.3	Inflammasome	15
1.3.1	AIM2-Inflammasom	18
1.4	Ziel der Untersuchung	20
2.	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Hautproben von Patienten	22
2.1.2	Zellen und Zellkultur	22
2.2	Analysemethoden	23
2.2.1	Stimulation und Transfektion der Zellen	23
2.2.2	Synthese von biotinylierter oder FITC-markierter DNA	24
2.2.3	Quantitative Real-Time PCR	25
2.2.3.1	RNA-Extraktion	25
2.2.3.2	cDNA-Synthese	25
2.2.3.3	qRT-PCR	26
2.2.4	Western-Blot	27
2.2.4.1	Proteinisolierung und -aufbereitung	27
2.2.4.2	Proteinkonzentrationsmessung	27
2.2.4.3	Western-Blot	28
2.2.4.4	Gel-Elektrophorese	28
2.2.4.5	Blotten auf PVDF-Membran	29
2.2.4.6	Färbung und Inkubation mit Antikörpern	29
2.2.5	Immunhistochemie	30
2.2.6	Immunfluoreszenz	31
2.2.7	TUNEL-Färbung zum Nachweis freier dsDNA	31
2.2.8	Präparation der Zytosolextrakte	32

2.2.9	Isolierung der biotinylierten DNA und Bestimmung des DNA-gebundenen LL- 37 (Dot-Blot)	33
2.2.10	Isolierung genomischer DNA (gDNA)	34
2.2.11	Experimentelle Zerstörung der oberflächlichen Hautbarriere	34
2.2.12	Bestimmung der zellulären LL-37-Aufnahme	34
2.2.13	IL-1 β -ELISA	34
2.2.14	Statistische Analyse	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	IL-1 β ist in psoriatischen Läsionen aktiviert	37
3.2	Keratinozyten in psoriatischen Läsionen produzieren erhöhte Mengen an AIM2	38
3.3	Zytosolische DNA induziert die IL-1 β -Ausschüttung in Keratinozyten über das AIM2-Inflammasom	42
3.4	Zytosolische DNA ist in Keratinozyten in psoriatischen Läsionen <i>in vivo</i> vorhanden	47
3.5	Das antimikrobielle Cathelicidin Peptid LL-37 vermindert die AIM2-abhängige IL-1 β -Sekretion durch Bindung an zytosolische DNA	50
3.6	LL-37 bindet an DNA im Zytosol und verhindert so die AIM2- Inflammasombildung	53
4.	Diskussion	62
4.1	Ein aktives AIM2-Inflammasom in Psoriasis	62
4.2	Zytosolische DNA als ein entscheidendes krankheits-assoziiertes molekulares Muster in Psoriasis	63
4.3	LL-37 als Regulator der Autoinflammation in Psoriasis	64

4.4	Posttranskriptionale Regulation der IL-1 β -Sekretion als Therapieansatz in Psoriasis	66
4.5	Cathelicidin als Angriffspunkt für neue Therapien in der Behandlung der Psoriasis	67
5.	Zusammenfassung	68
6.	Abkürzungsverzeichnis	71
7.	Abbildungsverzeichnis	74
8.	Literaturverzeichnis	78
	Veröffentlichung der Arbeit	84
	Danksagung	85

1. Einleitung

1.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine weit verbreitete, chronisch entzündliche Erkrankung der Haut, die 1-3% der Bevölkerung weltweit betrifft. Die Prävalenz weist starke Unterschiede in Abhängigkeit von Rasse und geographischer Region auf. Am häufigsten tritt Psoriasis in der europäischen und amerikanischen Bevölkerung auf, wohingegen die Prävalenz in der afrikanischen, afroamerikanischen und asiatischen Population sehr gering ist. Das männliche und weibliche Geschlecht sind in gleicher Weise von der Erkrankung betroffen (1-3).

Die Erstmanifestation der Erkrankung zeigt zwei Altersgipfel, anhand derer sich Psoriasis in zwei Subtypen einteilen lässt. Der erste Peak tritt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr auf (Typ-1-Psoriasis) und der zweite im Alter von 50-60 Jahren (Typ-2-Psoriasis) (3).

Die familiäre Häufung der Psoriasis lässt sich durch eine starke genetische Prädisposition erklären, jedoch konnte kein eindeutiges rezessives oder dominantes Vererbungsmuster nachgewiesen werden (1). Man geht von einer polygenen und multifaktoriellen Vererbung mit Schwellenwerteffekt aus (2, 3). Verschiedene Genorte, sogenannte Psoriasis-Suszeptibilitätsloci PSORS 1-10, vermitteln eine Veranlagung zur Manifestation der Erkrankung (3, 4).

Nach neuesten Erkenntnissen kommt es bei der Erkrankung zu einer Dysregulation des angeborenen Immunsystems, die durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems und so zu einem Zusammenwirken von Effektoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems in der Pathogenese der Psoriasis führt. Die Entzündungsmediatoren bewirken die Entstehung der Inflammation und erhalten den psoriatischen Entzündungsprozess in Form eines positiven Feed-Back-Kreislaufes aufrecht. Zellen der angeborenen Immunabwehr produzieren Schlüsselzytokine ($\text{TNF}\alpha$, Interferone, $\text{IL-1}\beta$, IL-6), die myeloide dendritische Zellen aktivieren. Die aktivierten dendritischen Zellen präsentieren Antigene und sezernieren die Inflammationsmediatoren IL-12 und IL-23 , welche die Differenzierung von Typ-17- und Typ-1-T-Helferzellen bewirken. Im Gegenzug

sezernieren T-Zellen die Mediatoren IL-17A, IL-17F und IL-22, welche Keratinozyten dazu veranlassen, antimikrobielle Peptide, proinflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL-1 β und IL-6, Chemokine und S100-Proteine zu produzieren (siehe Abbildung 1) (5).

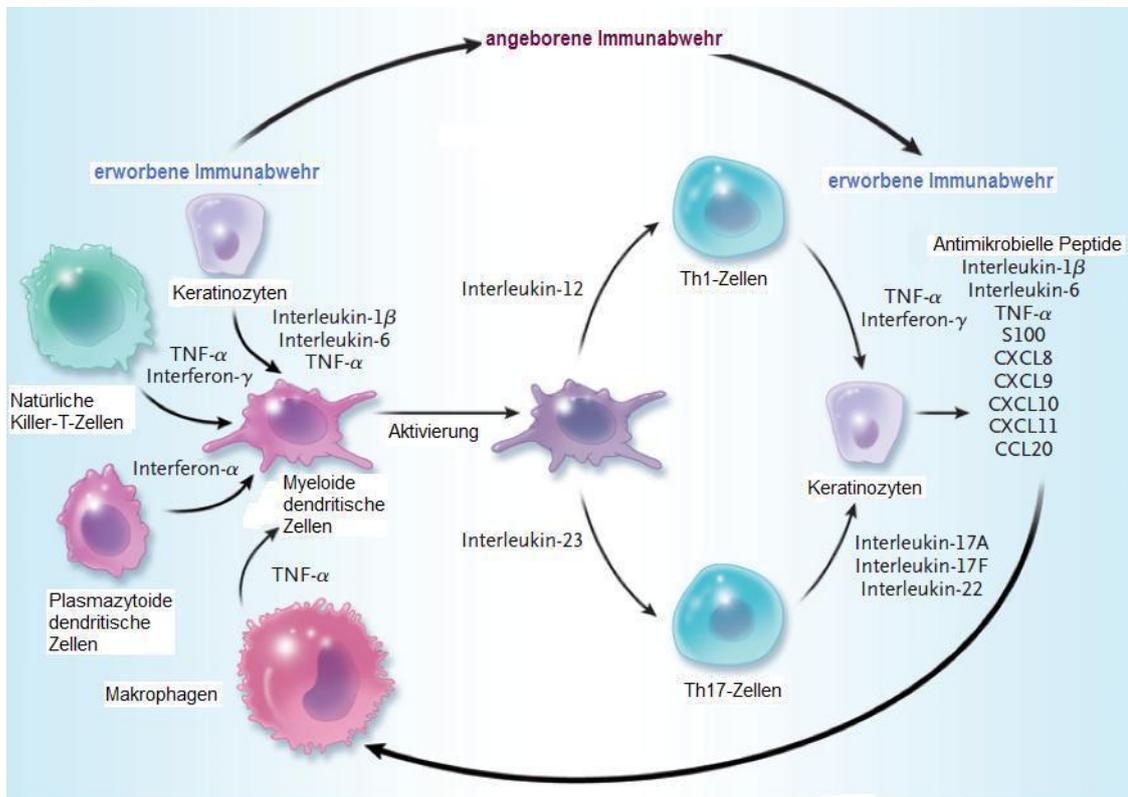


Abbildung 1: Schlüsselzellen und Mediatoren im Übergang vom angeborenen zum erworbenen Immunsystem in der Pathogenese der Psoriasis (modifiziert aus 5).

Als ein entscheidender Faktor in der Pathogenese und Entwicklung der Entzündungskaskade in der Haut bei Psoriasis wurde das Zytokin IL-1 β identifiziert (5). So ist die IL-23-getriggerte Entwicklung der Typ-17-T-Helferzellen (Th17) von der Anwesenheit von IL-1 β abhängig (6) und auch die Aktivierung und Induktion der Reifung und Zytokinproduktion der Th17-Zellen wird durch IL-1 β getriggert (7, 8). Konstitutive IL-1 β Aktivierung oder das Fehlen des IL-1-Rezeptor-Antagonisten in der Maus führen zu einer Th17-dominierenden Immunreaktion der Haut, die in ihrem Phänotyp der Psoriasis gleicht (9, 10); sogar in Abwesenheit von T-Zellen zeigt sich bei übermäßiger IL-1-Aktivierung eine Psoriasis-ähnliche Erkrankung der Haut bei Mäusen (11).

Auch beim Menschen ähneln transkriptionale Veränderungen in psoriatischen Läsionen Veränderungen, die durch IL-1 β induziert wurden, was eine Beteiligung von

IL-1 β an der Inflammation der Haut impliziert (12). In läsionaler Haut bei Psoriasis ist IL-1 β in erhöhter Konzentration zu finden, wobei es zu einem Großteil von Keratinozyten produziert wird (13, 14). Diese Untersuchungen geben Anlass für die Entwicklung von Medikamenten mit IL-1 β als direktem Angriffspunkt in der Therapie der Psoriasis. In kleinen Studien an Patienten, die unter einer schweren Form der Erkrankung leiden, zeigte dieser Weg schon erste Erfolge (15).

Die Psoriasis (Schuppenflechte) manifestiert sich als kutane Entzündung mit scharf begrenzten, erythematosquamösen, leicht erhabenen Plaques mit locker aufsitzender silbrig-weißer Schuppung. Histologisch ist ein entzündliches Infiltrat aus dendritischen Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen in Dermis und Epidermis zu erkennen. Durch Ausschüttung von VEGF (vascular-endothelial-growth-factor) kommt es zu Gefäßneubildung und korkenzieherartig gewundenen, weit gestellten, leicht verletzlichen Kapillaren. Die von den T-Zellen sezernierten Zytokine bewirken eine Proliferation der Epidermis mit bis zu 10-facher Geschwindigkeit, so dass es zu einer massiven Verdickung der Epidermis (Akanthose) und deutlichen Elongation der Reteleisten (Papillomatose) kommt. Durch den raschen Turnover der Keratinozyten haben diese nicht die Möglichkeit auszureifen, so dass sie beim Erreichen des Stratum corneum noch Zellkerne besitzen (Parakeratose) (2, 3).

Exogene Faktoren wie zum Beispiel Medikamente, Alkohol, Infektionen mit β -hämolisierenden A-Streptokokken, psychische Belastung oder lokale Hautschädigungen auf gesunder Haut (Koebner-Phänomen), können die Manifestation der Erkrankung triggern und das klinische Erscheinungsbild verschlechtern (3, 4).

Die Therapie der Psoriasis ist umfassend und es stehen viele therapeutische Optionen zur Verfügung. Bei Auswahl des geeigneten Therapieverfahrens gilt es viele Faktoren, wie Patientenalter, Manifestationsform, Ausdehnung der Erkrankung, Komorbidität, Familienplanung und auch Nebenwirkungsprofil der Medikation zu berücksichtigen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen topischer, systemischer und Phototherapie, wobei Glucocorticosteroide, Vitamin-D-Analoga, Vitamin-A-Analoga und Cignolin als topische Therapie, UVB-Bestrahlung und PUVA-Therapie als Phototherapie und Methotrexat, Ciclosporin und Retinoide als systemische Therapie eingesetzt werden (4). Als neue wirkungsvolle systemische Therapieform in der Behandlung der Psoriasis

sind in den letzten Jahrzehnten Biologicals entwickelt worden, die gezielt auf Moleküle einwirken, die in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen (1). Die Zukunft der Therapie liegt in der Entwicklung eines personalisierten medizinischen Programms, das auf der Analyse des individuellen Genoms und der individuell unterschiedlichen Dysregulationen des Immunsystems beruht, um die Nebenwirkungen der Medikamente und die Belastung und Sterblichkeit durch die Erkrankung möglichst zu minimieren (3).

1.2 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind kleine Moleküle, die aus weniger als 100 Aminosäuren bestehen und sowohl von Bakterien, Insekten und Pflanzen als auch von Vertebraten und humanen Zellen produziert werden (16, 17). Zum heutigen Zeitpunkt sind mehr als 1500 unterschiedliche AMPs bekannt (17).

Aufgrund ihres breiten antimikrobiellen Spektrums in der Abwehr gegen gramnegative und grampositive Bakterien, Viren, Pilze und bestimmte Parasiten gehören sie zur Gruppe der endogenen Antibiotika und stellen einen wichtigen Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr dar. Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung spielen diese Peptide aber auch eine große Rolle für das erworbene Immunsystem. Als Entzündungsmediatoren besitzen sie die Fähigkeit, durch chemotaktische Eigenschaften Entzündungszellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren, was auch als Alarminfunktion der AMPs bezeichnet wird. Auch bei der Wundheilung sind antimikrobielle Peptide durch reepithelialisierende Wirkung und Induktion der Angiogenese von großer Bedeutung (18).

Die Expression der AMPs im menschlichen Organismus ist sehr unterschiedlich und abhängig von Gewebe- und Zelltyp. In den meisten Fällen werden mehrere unterschiedliche Arten von AMPs exprimiert, die als Gruppe ihre Wirkung entfalten und dabei auch von anderen wirtsspezifischen Abwehrmolekülen, wie Laktoferrin und Lysozym, unterstützt werden (19, 20). In der Haut allein sind über 20 verschiedene antimikrobielle Peptide und Proteine entdeckt und identifiziert worden (19).

Unterschieden nach Größe, Aminosäuresequenz und Struktur lassen sich antimikrobielle Peptide in vier verschiedenen Kategorien klassifizieren: Peptide mit einer α -Helix-Struktur (z.B. humanes Cathelicidin), Peptide mit einer β -Faltblattstruktur mit Disulfidbrücken (z.B. humanes Defensin), Peptide mit einer erweiterten Struktur (z.B. Indolicidin) und Peptide mit einer Kreisstruktur (z.B. zyklisches Defensin) (17).

Die meisten AMPs sind kationisch geladen und weisen sowohl eine hydrophile als auch eine hydrophobe Seite auf. Diese strukturellen Eigenschaften sind für ihre Wirkungsweise wichtig: Die positiv geladenen antimikrobiellen Peptide gehen mit negativen Ladungen der Moleküloberfläche, insbesondere den Polysacchariden, Interaktionen ein und es kommt zu Wechselwirkungen zwischen AMP und Membran. Diese Polysaccharide sind vor allem in Form von Lipopolysacchariden in gramnegativen Bakterien und Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren und Lysylphosphatidylglycerol in grampositiven Bakterien zu finden, was das breite Wirkspektrum der AMPs begründet. Wegen ihrer amphipathischen Eigenschaften sind die AMPs in der Lage, sich in die Membran einzulagern und durch Herauslösen der Lipide Poren in die Membran zu bilden. Diese Zerstörung der Membranstruktur führt zu einer Aufhebung des Membranpotentials und somit zur Lyse der Zielzelle (19, 20).

Aufgrund der oben erwähnten mikrobiziden Mechanismen tritt eine Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Peptiden selten auf (20). Solche Resistenzentwicklungen stellen z.B. Modifikationen von Effluxpumpen (21) oder Veränderungen von Oberflächenstrukturen und Membranangriffspunkten der Mikroorganismen dar (22).

Antimikrobielle Peptide sind genkodiert. Dies bedeutet, dass ein Gen ein bestimmtes Peptid kodiert (23). Genfamilien strukturell verwandter Moleküle sind im Genom häufig in Clustern angeordnet und bilden sich auch in unterschiedlichen Spezies auf bestimmten chromosomalen Regionen ab, was einen Hinweis auf die evolutionäre Entwicklung des angeborenen Immunsystems darstellt (23). Das primäre Translationsprodukt ist ein Präpropeptid, bestehend aus einer N-terminalen Signalsequenz, die auf das endoplasmatische Retikulum abzielt, einem Prosegment und einem C-terminalen kationischen Peptid. Die N-terminale Sequenz wird beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum abgespalten. Das Prosegment ist häufig

anionisch geladen und besitzt zahlreiche biologische Funktionen, wie die Inhibition des reifen Peptids und das korrekte Falten des C-Terminus. Die eigentliche antimikrobielle Aktivität kommt dem C-terminalen Peptid zu. Gewöhnlich werden antimikrobielle Peptide, wie zum Beispiel Cathelicidin/LL-37, als Propeptide oder reife C-terminale Peptide in den Zellen gespeichert (23).

Die Expression der Peptide ist sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranskriptionaler Ebene streng reguliert (17). In epitheliale Gewebe oder Entzündungszellen sind die AMPs besonders exprimiert, da sie dort für die Abwehrreaktion des Körpers gegen Erreger gebraucht werden (20). Einige Peptide, wie humanes β -Defensin 1 (hBD-1) oder Maus- β -Defensin 1 werden generell immer exprimiert, während die Sekretion anderer Peptide, wie hBD-2, hBD-3, hBD-4 und LL-37 durch den Kontakt mit Bakterien oder proinflammatorischen Mediatoren induziert und hochreguliert wird (20).

Die zwei Hauptgruppen der antimikrobiellen Peptide im menschlichen Organismus stellen die Defensine und Cathelicidine dar. Diese werden vor allem an den Körperoberflächen exprimiert, die wie Haut oder Mucosaepithel in direktem Kontakt zur Umwelt stehen, um einer pathogenen Besiedlung vorzubeugen. Darüber hinaus werden sie in Vesikeln von Phagozyten und Granulozyten gespeichert und bei Bedarf durch bestimmte Stimuli aktiviert und an die Oberfläche sezerniert (17).

1.2.1 Cathelicidin

Cathelicidine sind eine Gruppe von antimikrobiellen Peptiden, denen eine hoch konservierte „Cathelin“-Prosequenz (= Cathepsin-L-Inhibitor) gemeinsam ist, wobei die C-terminale Domäne starke Heterogenität aufweisen kann (20). Im menschlichen Organismus ist bislang nur ein einziges Cathelicidin-Gen (CAMP) bekannt, das für ein inaktives Vorläuferprotein mit einer Größe von 18kDa kodiert und deswegen hCAP18 genannt wird (19). Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 3p21 und setzt sich aus vier Exons zusammen (24). Das Vorläuferprotein hCAP18 wird in Vesikeln von Neutrophilen, NK-Zellen oder Mastzellen, aber auch Epithelzellen von Haut, Lunge, Magen-Darmtrakt, Brustdrüse oder Epididymis gespeichert und bei Bedarf das aktive

antimikrobielle Peptid LL-37 prozessiert, indem aus dem Carboxy-(C-)-Terminus des Vorläuferproteins ein antimikrobielles Peptid aus 37 Aminosäuren bestehend und mit zwei Leucinaminosäuren beginnend freigesetzt wird (19). Diese Prozessierung ist ein wesentlicher Faktor für die Aktivierung der antimikrobiellen Aktivität *in vivo* und wird durch Serinproteasen, wie z.B. Kallikrein aus Keratinozyten und Proteinase 3 aus neutrophilen Zellen ausgeführt (19, 25-27).

Die LL-37-Expression ist sowohl während der Transkription als auch in den post-translationalen Prozessen in der Umwandlung zum aktiven Peptid streng reguliert (24). In Keratinozyten gesunder Haut ist LL-37 normalerweise nur in geringem Maße exprimiert (28). 1,25-Dehydroxy-Vitamin D3 stellt einen starken Induktor der mRNA-Transkription von Cathelicidin dar und führt zur Hochregulation des Genes (24, 28).

Wie oben bereits erwähnt, haben auch Cathelicidine eine große antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und -negative Bakterien, Viren und Pilze (24). Mit ihrer positiven Ladung binden sie an die negativ geladene Zellmembran der Mikroben. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass menschliches Cathelicidin als Lipopolysaccharidbindeprotein an Lipopolysaccharide (LPS) der Zellmembran bindet und so die LPS-abhängige TNF α -Expression der CD14⁺-Zellen supprimiert wird, was die Letalität der Mäuse durch LPS erheblich reduzierte (29-31). Darüber hinaus ist LL-37 in der Lage, direkt die Funktion von TLR4 auf dendritischen Zellen zu blockieren. Dies verhindert die Reifung der dendritischen Zellen und ihre Antwort auf LPS oder andere TLR4-Liganden (24).

Außerdem besitzt LL-37 chemotaktische Fähigkeiten gegenüber Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen, indem es den G-Protein-gekoppelten FPRL1 (Formylpeptide-Receptor-Like-1) aktiviert (32). Über diesen FPRL1-Rezeptor ist LL-37 auch in der Lage, Angiogenese zu vermitteln (33). Neben dem FPRL1-Rezeptor induziert und aktiviert Cathelicidin auch den epidermal-growth-factor-receptor (EGFR) in den humanen Keratinozyten, was eine Migration der Keratinozyten bewirkt (34). Über eine direkte oder indirekte Aktivierung des EGFR stimuliert LL-37 die IL-8-Sekretion in Keratinozyten und epithelialen Zellen des Respirationstraktes (35, 36). Ein weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptor, P2X7, ist ebenfalls durch LL-37 induzierbar, was eine Steigerung der IL-1 β -Produktion und Ausschüttung bewirkt (37). Eine Erklärung für die

Wirkungen und Effekte von LL-37 an den verschiedensten Rezeptoren, wie TLR4, EGFR, FPRL1 und P2X7, die es zu einem wesentlichen Effektormolekül des angeborenen Immunsystems machen, könnte dadurch begründet werden, dass Cathelicidin nicht an den Rezeptor selbst, sondern an die den Rezeptor umgebenden Strukturen der Zelloberfläche bindet und durch deren Modifikation seine Wirkung erzielt (38) .

1.2.2 Cathelicidin und Psoriasis

Neben der großen Bedeutung von Cathelicidin-Peptid LL-37 in der Abwehr gegen Infektionskrankheiten (17, 39-41), aber auch der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinal- und Respirationstraktes (42-44), spielt es auch eine entscheidende Rolle in entzündlichen Erkrankungen der Haut.

Patienten mit Psoriasis leiden signifikant weniger unter Infektionen der Haut, während Personen, die an atopischer Dermatitis erkrankt sind, mit vermehrter Infektanfälligkeit zu kämpfen haben. In Analogie dazu wurde in läsionaler psoriatischer Haut im Gegensatz zu gesunder Haut eine vermehrte Cathelicidin- und hBD-2-mRNA und Proteinexpression nachgewiesen. Außerdem wurden hBD-3 und hBD-2 erstmals in psoriatischer Haut identifiziert. Weitere AMPs, wie HNP-1, -2, -3, S100A7 („Psoriasin“), SKALP/elafin und SLPI/ALP sind in psoriatischen Schuppen in erhöhter Konzentration zu finden. Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis hingegen zeigte vermindertes Vorkommen von AMPs, wie hBD-2 und hBD-3, was die Assoziation mit zahlreichen Infekten erklären könnte (24).

Trotz der positiven antibakteriellen Effekte von LL-37 in Psoriasis wurde bislang angenommen, dass die hohen Spiegel dieses AMPs in Psoriasis möglicherweise auch unerwünschte Entzündungsreaktionen bewirken. Lande et al. zeigten, dass Cathelicidin mit körpereigenen DNA-Fragmenten, die durch vermehrte Apoptose in psoriatischer Haut anfallen, einen Komplex bildet, der in der Lage ist, TLR9 in plasmazytoiden dendritischen Zellen zu aktivieren. Dies resultiert in der Ausschüttung von $IFN\alpha$ und $IFN\beta$, die über Induktion der myeloiden dendritischen Zellen zur Aktivierung der autoreaktiven Th1- und Th17-Zellen führt. Wie oben bereits dargestellt, folgt aus der Aktivierung der T-Zellen die Produktion von $IFN\gamma$, IL-22, IL-17 und auch Cathelicidin LL-

37. Hiermit ist ein sich selbst triggernder Feedback-Mechanismus beschrieben, der die Entstehung der Entzündungsreaktion in Psoriasis erklären könnte (17, 19, 45). Auch der Mechanismus des bei Psoriasis auftretenden Koebner-Phänomens könnte über diesen Signalweg vermittelt werden, da Verletzung eine erhöhte LL-37-Ausschüttung bewirkt und diese den Circulus vitiosus in Gang setzt (45).

1.3 Inflammasome

Entzündung stellt die Antwortreaktion eines Wirtsorganismus auf verschiedene Toxine, infektiöse Erreger oder einen Gewebeschaden dar. Für den menschlichen Organismus ist es lebenswichtig, eingedrungene Mikroorganismen zu eliminieren und zu bekämpfen. Aus diesem Grund besitzt der Körper eine Reihe von Mechanismen, um den Eindringling zu erkennen und zu bekämpfen. Grundsätzlich werden zwei komplexe Systeme unterschieden, das angeborene, unspezifische und das erworbene, spezifische Immunsystem. Ersteres - bestehend aus Makrophagen, Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen, NK-Zellen und Mastzellen, außerdem einer Reihe von Zytokinen, Komplementfaktoren und antimikrobiellen Peptiden - ist für das unmittelbare Erkennen und Eliminieren schädlicher Erreger verantwortlich. Die Immunzellen dieses Systems werden sofort nach der Begegnung mit dem Eindringling aktiviert und sezernieren ein breites Spektrum an antimikrobiellen Substanzen, die zu den typischen Zeichen der Entzündung, wie Rubor, Calor, Dolor, Tumor und Functio laesa, führen (46). Das adaptive Immunsystem hingegen besitzt ein immunologisches Gedächtnis und baut auf ein Repertoire aus spezifischen antikörperproduzierenden Lymphozyten, weshalb es gewisse Zeit benötigt, um zu agieren.

Eine wesentliche Eigenschaft des angeborenen Immunsystems ist die Fähigkeit, eingedrungene Erreger von körpereigenen Substanzen zu unterscheiden. Dies bewerkstelligt es durch das Erkennen von gewissen mikrobiellen Strukturen, wie Lipopolysacchariden, Peptidoglykanen, Flagellin oder mikrobiellen Nukleinsäuren, die „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ (PAMP) genannt werden (47, 48). Das Erkennen solcher PAMPs wird durch keimbahncodierte Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (pattern-recognition-receptors) vermittelt, zu welchen Toll-like-

Rezeptoren (TLRs), C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLRs), die RIG-like-Helikase (RLRs), die NOD-like-Rezeptoren (NLRs) und die zytosolischen DNA-Sensoren DAI, RNA-Polymerase III und AIM2 gehören (49).

Die NOD-like-Rezeptor-Familie ist eine Gruppe aus bis jetzt 23 im menschlichen Organismus bekannten intrazellularen Immunrezeptoren. Sie zeichnen sich durch eine zentrale Nukleotid-Binde- und Oligomerisationsdomäne (NACHT), die normalerweise an die C-terminalen Leucin-rich-repeats (LRRs) angrenzt, und eine N-terminale Caspase-Rekrutier-(CARD) oder Pyrin-Domäne (PYD) aus (50). Von der LLR-Domäne wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der Autoregulation, dem Erkennen von PAMPs und bei Protein-Protein-Interaktionen spielt. Die NACHT-Domäne ist in der Lage, den Signalkomplex über ATP-abhängige Oligomerisation zu aktivieren. Die CARD- und Pyrin-Domäne sind durch das Rekrutieren von Adaptor- und Effektormolekülen für das „downstream“-Signalisieren zuständig (46, 47, 50, 51). Anhand der Unterschiede in der N-terminalen Domäne werden die NLRs in verschiedene Gruppen eingeteilt (52). Die größte Gruppe besitzt eine N-terminale Pyrin-Domäne und wird deswegen als „NLRP“ oder „NALP“ bezeichnet. Weitere Subkategorien stellen NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC4 (IPAF oder CARD12) oder NAIP5 dar (46).

Die Besonderheit der Mitglieder der NLR-Familie besteht in ihrer Fähigkeit, als Antwort auf verschiedene Reize einen Multiproteinkomplex zu formieren, der zur Aktivierung von inflammatorischen Caspasen führt. In Analogie zu den Apoptosomen, welche die Apoptose-induzierenden Caspasen (Caspase-9, -8, -2) aktivieren (53), werden diese NLR-Komplexe „Inflammasome“ genannt, da sie in menschlichen Zellen die inflammatorischen Caspasen-1, -4 und -5 aktivieren (46, 50, 54). Solche Inflammasomkomplexe bilden sich in myeloischen Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen, können aber auch in Keratinozyten gefunden werden (50).

Caspasen sind Cysteinproteasen, die an zahlreichen streng regulierten Prozessen innerhalb der Zelle, wie Apoptose, Entzündung, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind oder diese ausführen. Sie werden als inaktive Zymogene synthetisiert, die aus einer N-terminalen Prodomäne variabler Länge und zwei Untereinheiten, die zusammen die Protease-Domäne darstellen, bestehen. Anhand ihrer Funktion

innerhalb der Zelle kann man proinflammatorische und proapoptotische Caspasen unterscheiden (50). Erstere stellen die Caspasen-1, -4 und -5 im Menschen und -1, -11 und -12 in der Maus dar (55). Die am besten charakterisierte Caspase stellt Caspase-1 dar, deren katalytische Aktivität durch signalabhängige Selbstaktivierung in den sogenannten Inflammasomen streng reguliert ist. Die Inflammasome vermitteln eine Caspase-1-abhängige Prozessierung der Zytokine IL-1 β und IL-18 (54, 56).

Interleukin-1 β stellt einen wichtigen Entzündungsmediator dar, der bei der Immunantwort in der Bekämpfung von Infektionen und Verletzungen, aber auch der Fieberentstehung, Lymphozytenaktivierung und Vermittlung von Leukozyteninfiltration an den Ort der Entzündung eine Rolle spielt (56, 57). Die IL-1 β -Aktivität unterliegt sowohl auf transkriptionaler als auch posttranskriptionaler Ebene strengen Kontrollen. Proinflammatorische Signale, wie z.B. TNF α induzieren über Aktivierung von Nuclear-factor- κ B (NF- κ B) die Transkription von IL-1 β , während auf posttranskriptionaler Ebene die Aktivierung über die Spaltung seiner inaktiven Proform pro-IL-1 β erfolgt (58). Diese Reaktion wird durch Inflammasome katalysiert und reguliert. Defekte auf Ebene der posttranskriptionalen Regulation können entzündliche Hautkrankheiten hervorrufen (9).

IL-18, das zur selben Zytokinfamilie wie IL-1 β gehört, besitzt keine pyogene Aktivität, sondern ist hauptsächlich dafür bekannt, IFN γ in aktivierten T-Zellen und NK-Zellen zu induzieren und so zur Polarisierung von Th1-Helferzellen beizutragen (56).

Die exakte Abfolge von Signalen, die zur Inflammasomaktivierung führt, ist für alle Inflammasome bis jetzt noch nicht genau erforscht. Man nimmt an, dass durch bestimmte Stimuli ausgelöst das jeweilige Inflammasom oligomerisiert und entweder direkt über CARD-Interaktion, wie z.B. bei NLRP1 oder NLRC4, oder indirekt über ein eine CARD-Domäne enthaltendes Adapterprotein, apoptosis-associated-speck-like protein (ASC), pro-Caspase-1 rekrutiert wird. In ruhenden Zellen ist Caspase-1 als katalytisch inaktives Proenzym vorhanden, durch die Bildung des Inflammasomkomplexes wird jedoch die autokatalytische Aktivierung des Enzyms in Gang gesetzt. Die aktivierte Caspase-1, ursprünglich bekannt als IL-1-converting-Enzym (ICE), katalysiert nun die Umwandlung von pro-IL-1 β in seine aktive Form IL-1 β , aber

auch die Spaltung anderer Zytokine derselben Familie, wie pro-IL-18 und pro-IL-33 wird durch Caspase-1 katalysiert. Zusammen mit der Ausschüttung der Zytokine kann es unter bestimmten Umständen auch zu einem durch Caspase-1 vermittelten Tod der Zelle, der Pyroptose, kommen. Pyroptose stellt eine Mischform der Apoptose und Nekrose dar, die durch Fragmentierung der DNA und Bildung von Poren in die Zellmembran verbunden mit Lyse der Zelle gekennzeichnet ist (46).

Das am weitesten erforschte und am besten charakterisierte Inflammasom stellt NLRP3 (NALP3) dar, welches über ASC Caspase-1 aktiviert. Eine Vielzahl mikrobieller Stimuli, wie Viren, Bakterien, Protozoen und Pilze, aber auch Kristalline, Asbest, Harnsäure, Poren-bildende Toxine, extrazelluläres ATP, nekrotische Zellkomponenten und niedriger intrazellulärer Kaliumgehalt besitzen die Eigenschaft, dieses Inflammasom zu aktivieren (59, 60).

1.3.1 AIM2-Inflammasom

Zu den drei bekannten Inflammasomen der NLR-Familie wurde nun ein vierter Inflammasomenkomplex, genannt „Absent in Melanoma-2“ (AIM2), entdeckt und identifiziert, der erstaunlicherweise kein Mitglied der NOD-Like-Rezeptor-Gruppe enthält, sondern aus einer HIN-200- und einer PYD-Domäne besteht. AIM2 gehört zur Familie der IFN-induzierbaren HIN-200-Proteinfamilie, deren Proteine von strukturell verwandten Genen in Maus und Mensch codiert werden. All diese Proteine zeigen eine charakteristische Wiederholung von 200 Aminosäuren und finden sich vorzugsweise im Kern der Zelle, während AIM2 seinen Sitz im Zytoplasma der Zellen hat (60-62).

Als bekannt war, dass NLRP3 aus der NLR-Familie als Antwort auf adenovirale DNA in der Lage ist, Caspase-1 zu aktivieren (63) und zusätzlich noch eine NLRP3-unabhängige, jedoch ASC-abhängige Caspase-1-Aktivierung als Reaktion auf transfizierte DNA entdeckt wurde (63), identifizierten Hornung et al. AIM2 als neuen Rezeptor für zytoplasmatische DNA, der als Reaktion zusammen mit ASC ein Inflammasom formiert und Caspase-1 aktiviert (64).

Das AIM2-Inflammasom, das sich aus AIM2, ASC und Caspase-1 zusammensetzt, bindet direkt über die HIN-200-Domäne zytosolische Doppelstrang-DNA und führt über Bindung des Adaptorproteins ASC an die PYD-Domäne zur Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-1. Wie bereits bei den anderen Inflammasomen bekannt, aktiviert und reguliert die Autoaktivierung von Caspase-1 die Reifung und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 (50, 60). Außerdem führt Caspase-1-Aktivierung zu einer besonderen Art des Zelltodes, der Pyroptose (65) (siehe Abbildung 2). Die die Caspase-1-aktivierende DNA kann sowohl viral, bakteriell, von Säugetieren stammend oder synthetisch hergestellt werden, muss jedoch Doppelsträngigkeit aufweisen (64-67).

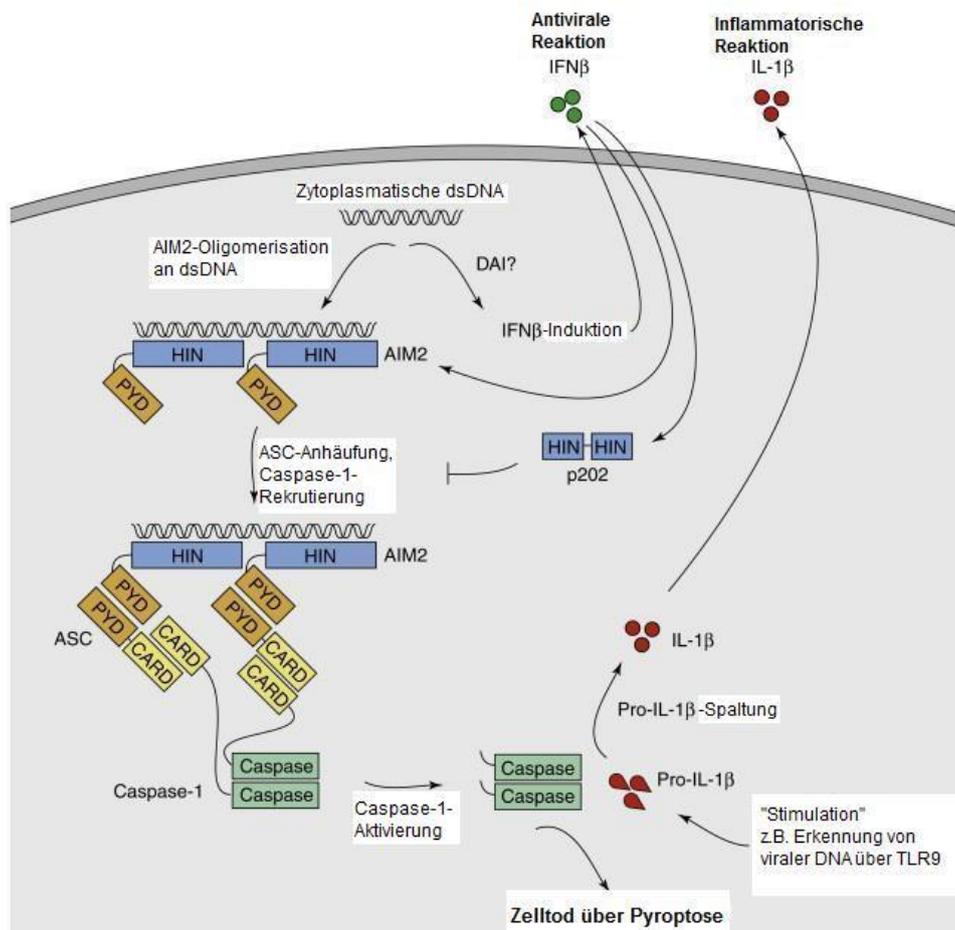


Abbildung 2: Modell für die Aktivierung des AIM2-Inflammasoms durch zytosolische DNA (65). Das AIM2-Inflammasom bindet direkt über die HIN-200-Domäne zytosolische Doppelstrang-DNA und führt über Bindung des Adaptorproteins ASC an die PYD-Domäne zur Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-1. Die Autoaktivierung von Caspase-1 aktiviert und reguliert die Reifung und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 (50, 60). Die Caspase-1-Aktivierung führt zur Pyroptose, einer besonderen Art des Zelltodes (65).

Rathinam et al. untersuchten anhand von AIM2-defizienten Mäusen die Rolle von AIM2 in Makrophagen und dendritischen Zellen genauer und stellten AIM2 als einen wichtigen Caspase-1-abhängigen antimikrobiellen Sensor und Schlüsselfaktor in Reaktion auf *Francisella tularensis*, Kuhpockenvirus und Maus-CMV heraus sowie als einen Mitwirkenden an der Abwehr gegen *Listeria monocytogenes*, der die Prozessierung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 in Reaktion auf Doppelstrang-DNA reguliert (49).

Da AIM2 - wie oben erwähnt - auch in der Lage ist, DNA von menschlichen Zellen zu erkennen, stellt sich die Frage, inwieweit dieser DNA-Sensor auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Immunkrankheiten beteiligt ist. Für den systemischen Lupus erythematodes (SLE), eine Autoimmunkrankheit aus der Gruppe der Kollagenosen, ist bereits bekannt, dass es zur Formierung von Immunkomplexen aus Doppelstrang-DNA kommt, die mithilfe autoreaktiver Antikörper gebildet werden. Außerdem wurden bei SLE-Patienten erhöhte Spiegel an IL-1 β nachgewiesen. Die Identifizierung von AIM2 in dieser Krankheit und die Verbindung zu IL-1 β stellt Gegenstand weiterer Forschungen dar. Die Fähigkeit Pyroptose, einen Caspase-1-abhängigen Zelltod, zu induzieren und die Tatsache, dass Deletionen und Mutationen in dem für AIM2 codierenden Gen beim Kolonkarzinom gefunden wurden (68), führen zur Vermutung, dass AIM2 auch einen suppressiven und protektiven Effekt auf die Tumorgenese vermitteln könnte. Doch um diese Annahmen und Möglichkeiten zu bestätigen und die genaue Rolle und Funktion von AIM2 hierbei zu bestimmen, sind noch weitere Forschungen und Experimente notwendig, die aufgrund der Relevanz in Bezug auf Therapieoptionen unbedingt zu verfolgen sind (60, 69).

1.4 Ziel der Untersuchung

Psoriasis stellt eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Haut dar, in welcher IL-1 β eine zentrale Stellung einnimmt. Posttranskriptionale Aktivierung von IL-1 β wird durch Inflammasome vermittelt, welche in Psoriasis aktiviert sind (13), wobei die das Inflammasom aktivierenden Mechanismen in Psoriasis noch nicht bekannt sind. Zytosolische DNA wurde als Stimulus des einen DNA-Sensor enthaltenden AIM2-

Inflammasoms identifiziert (64). Außerdem ist das antimikrobielle Peptid Cathelicidin LL-37 in psoriatischer Haut in erhöhter Konzentration zu finden (24, 70).

Die Ziele der vorliegenden Dissertation waren deshalb, die Rolle des AIM2-Inflammasoms in Psoriasis zu untersuchen und die das Inflammasom triggernden Faktoren zu identifizieren und nachzuweisen. Darüber hinaus sollte die Bedeutung des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin LL-37 für die Erkrankung und seine Funktion in der Inflammasomaktivierung untersucht werden, um die Entstehung der Autoinflammation in der Pathogenese der Psoriasis im Hinblick auf neue Therapieoptionen besser zu verstehen (70).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hautproben von Patienten

Alle Hautbiopsien von Patienten und gesunden Probanden wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Universität Kiel genehmigt. Die Einverständniserklärung aller Probanden lag vor. Bei den Proben handelte es sich um 4mm-Stanzbiopsien von unbehandelten psoriatischen Plaques und von nicht betroffenen Hautarealen derselben Patienten. Zusätzlich wurden Hautbiopsien von gesunden freiwilligen Probanden und Patienten mit atopischer Dermatitis als Kontrollreferenzen verwendet. Für die Durchführung der mRNA-Analysen wurden die Proben direkt nach Entnahme in 1ml Trizol[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Um die Proteinexpression zu untersuchen wurden die Biopsien zu 200µl eines Radioimmunoprecipitation-assay (RIPA)-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 140mM NaCl, 1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) gegeben und gleichmäßig vermischt.

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. Für diese Arbeit wurden primäre, normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) (Cascade Biologics, Karlsruhe, Deutschland) und C57BL/6-Wildtyp-Makrophagen, die CFP-ASC überexprimieren, verwendet (V. Hornung, Universität Bonn).

NHEK wurden in EpiLife[®]-Zellkulturmedium mit 0,06mM Calcium und 1xEpiLife[®]-defined-growth-supplement (EDGS, Cascade Biologics) bei 37°C unter Standardbedingungen unter Zusatz von Antibiotika kultiviert. Die Ausgangskulturen konnten bis zu fünf Mal passagiert werden.

Alle Zelllinien wurden in 75cm³-Flaschen, 6-, 12- oder 24-Lochplatten bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert (PAA Laboratories, Pasching, Österreich). Die jeweils verwendeten Kulturgefäße mussten vor der Überführung von NHEK mit einer Coating-Matrix (Cascade Biologics) beschichtet werden. Das alte Medium der 75cm³-Zellkulturflasche wurde abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden 2ml 1xTrypsin EDTA (Cascade Biologics) hinzupipettiert und im Brutschrank 4 Minuten gelöst. Die Kontrolle der Ablösung erfolgte unter dem Mikroskop. Zur Neutralisierung wurden 2ml Trypsininhibitor (Cascade Biologics) und EpiLife[®] mit Zusätzen zugegeben. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50ml-Falcon wurde diese 10 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 900rpm 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 pro 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.

Die Makrophagen wurden entsprechend der Keratinozyten kultiviert, wobei DMEM (PAA) mit 10% FCS-DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin als Nährmedium verwendet wurde.

2.2 Analysemethoden

2.2.1 Stimulation und Transfektion der Zellen

Bei einer Konfluenz von 30 bis 60% wurden die Zellen für bestimmte Zeitperioden mit Cathelicidin-Peptid LL-37 (1 bis 10µg/ml; Innovagen), Cathelicidin-Peptid dLL-37 (ein Enantiomer von LL-37 mit D-Aminosäuren) (10µg/ml), S100A15 (10µg/ml), S100A7 (10µg/ml), ZnCl₂ (100nM), IFN γ (1 bis 100ng/ml; Biomol), TNF α (10ng/ml; Biomol), IL-17A, Lipofectamin-RNAiMAX-Reagent (Invitrogen), DNase I (1IU/µg; Ambion) und/oder poly(dA:dT) (4µg/ml; Sigma) stimuliert.

Als Negativkontrolle erfolgte ausschließlich die Zugabe der entsprechenden Menge Lösungsmittel, in denen das jeweilige Stimulans gelöst war bzw. LipofectaminTMRNAiMAX-Reagent (Invitrogen).

NHEKs, die eine Konfluenz von ungefähr 30% zeigten, wurden mit siRNAs mit LipofectaminTMRNAiMAX transfiziert. Dabei wurden die folgenden siRNA-Sequenzen eingesetzt: Kontroll-siRNA 1 (5'-GCGCAUUCAGCUUACGUUU), Kontroll-siRNA 2 (5'-GCGCAUUCAGCUUACGUUU), AIM2-siRNA 1 (5'-GAAACGAGGACACAAUGAATT), AIM2-siRNA 2 (5'-GCACCAUAAAGGUUAUUA), P2X7-siRNA 1 (5'-AUCCAGAGCAUGAAUUAUG) und P2X7-siRNA 2 (5'-AGAAACGGACUCUGAUAAA). Für die Herunterregulation aller bekannten P2X7-Isoformen (A-J) wurde eine Mischung aus P2X7-siRNA 1 und 2 zugegeben.

Die siRNAs wurden mit einer Konzentration von 20nM, poly(dA:dT) mit 4µg/ml und die mit Biotin- oder FITC-markierte DNA mit 2-4µg/ml mit LipofectaminTMRNAiMAX-Reagent (Invitrogen) in die Keratinozyten bzw. Makrophagen transfiziert.

2.2.2 Synthese von biotinylierter oder FITC-markierter DNA

Um biotinylierte, FITC-markierte oder unmarkierte 300 oder 1000 Basenpaare (Bp) große DNA-Fragmente herzustellen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von menschlicher genomischer DNA, die aus NHEK (Cascade Biologics, Karlsruhe, Deutschland) isoliert wurde, durchgeführt. Dabei wurden forward- und reverse-Primer verwendet, die zuvor mit FITC oder Biotin konjugiert worden waren (MWG, Biotech), beziehungsweise für nichtmarkierte DNA wurden unkonjugierte Primer (MWG, Biotech) verwendet. Die Endprodukte der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden in einem Agarose-Gel analysiert und mithilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. FITC-DNA oder Biotin-DNA wurden in einer Konzentration von 2-4µg/ml eingesetzt.

2.2.3 Quantitative Real-Time 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 5 Minuten 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; 12000rpm). 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; 12000rpm). Der Isopropanolüberstand wurde abgegossen, das erhaltene Pellet zum Waschen mit 1ml 75%igem Ethanol gevortext und nochmals zentrifugiert (4°C; 5min; 7500rpm). Der Überstand wurde abgeschüttet und die RNA 15-20min luftgetrocknet. Die trockenen Proben konnten nun in 25µl RNase-freies 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-Synthesekit für qRT (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Pro Ansatz wurden 10µl RT-Puffer, 1µl Random-Hexamer-Primer-Set, 2µl M-MuLV RNase H⁺-reverse-transkriptase und 7µl der jeweiligen RNA-Probe gemischt. Im Veriti™ Thermal-Cycler (Applied Biosystems, Foster 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, pro-IL-1 β , IL-1 β , AIM2 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 und AIM2. Das bedeutet, dass das Expressionsniveau in unbehandelten Keratinozyten gering ist. Zuvor durchgeführte Tests (Y. Dombrowski, M. Peric, S. Koglin) belegten, dass die Expression von PBGD durch die Behandlung von 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: 0,1 μ l Primer PBGD (MWG, Ebersberg, Deutschland), 0,1 μ l Probe PBGD, je 0,2 μ l Primer forward und reverse des zu testenden Gens, 0,1 μ l Probe des zu testenden Gens, 2 μ l Reaktionsmix mit den notwendigen Nukleotiden (alle Reagenzien Roche) und 4,3 μ l bidestilliertes Wasser. Von diesem Mastermix wurden je LightCycler-Kapillare 7 μ l zu 3 μ l der jeweiligen cDNA-Probe pipettiert. Nach einer Zentrifugation (4°C; 30sek; 1000rpm) 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 1 detailliert aufgeführt. Von allen Analysen wurden Triplikate von zwei bis drei unabhängigen Zellstimulationen angefertigt.

Zielgen	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Cathelicidin	5' TCGGATGCTAACCTCTACCG 3'	5' ACAGGCTTTGGCGTGTCT 3'
Pro-IL-1 β	5' CTGTCCTGCGTGTGAAAGA 3'	5' TTGGGTAATTTTGGGATCTACA 3'
AIM2	5' ATGGAGAGTAAATACAAGGAG ATACTCTT 3'	5' TGTTTTTTTTTGGCCTTAATAAC CTTTATG 3'
PBGD	5' ATGTCAAGGGCCAAGTC 3'	5' AGGAATCGGGGGTGTGTC 3'
BIOTEG 300DNA	5' AACCCAGTCAGCCTCATGAG 3'	5' TTGTCCTGGTGAAGCACCC 3'

Tabelle 1: 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-Puffer (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdeoxycholate, 0,1% SDS, 140mM NaCl, 1mM PMSF) verwendet. Nach Zugabe von jeweils 100 μ l 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; 5000rpm), 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 30µl (Gel 1,0mmx10well) bzw. 20µl (Gel 1,5mmx15well) 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 7,5µl Sample-Puffer (NuPAGE-LDS-Sample-Buffer, Invitrogen), sowie 3µl 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-Puffer (NuPAGE-MES-SDS-Running-Buffer-20x, Invitrogen) gefüllt. Nach dem Entfernen des Kammes konnten die Proteinproben, sowie 10µl 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 circa 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. 10 Sekunden in 100% Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aktiviert, mit destilliertem Wasser gewaschen und ca. 20min in NuPAGE-Transfer-Puffer (Invitrogen) eingelegt werden. Die Gelkammer wurde zerlegt und das Gel ebenfalls kurz in Transfer-Puffer gelegt. In der Blotordnung lagen Gel und Membran unmittelbar aufeinander, umgeben von Filterpapieren und Wattepad, die zuvor ebenfalls mit Transfer-Puffer 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), pH 7,5) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-LL37-Antikörper aus Kaninchen (Innovagen) 1:1000 in 0,5% Western-Blocking-Reagent) bei 4°C über Nacht. 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-PlusTM-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 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 15 Minuten.

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 dem Nachweis von AIM2. Hierfür wurden Paraffinschnitte läsionaler Hautgewebeproben entparaffiniert, mit Protease (bacterial Proteinase; Sigma) demaskiert und über Nacht mit einem polyklonalen AIM2-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 HRP-konjugierten 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 inkubiert. 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-Mikroskop (TissueGnostics, Wien, Österreich) bei 100- bis 200-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

2.2.6 Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenz sollte ebenfalls Cathelicidin in der Haut von Psoriasispatienten nachgewiesen werden. Hierfür wurden primäre Keratinozyten oder C57/Bl6-Wildtyp-Makrophagen, die CFP-ASC überexprimieren in Chamberslides ausgesät und daraufhin das Cathelicidin LL-37-Peptid mithilfe des Lightning-Link-Rhodamine-conjugation-Kit (Innova Biosciences) mit Rhodamin in den Zellen markiert. Nach drei Waschschritten mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS) und Zugabe von 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) enthaltender ProLong-Gold-antifade-Reagenz (Invitrogen) wurden die Schnitte mit dem aufgesetzten Deckgläschen über Nacht getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate mit dem TissueFAXS-System-Mikroskop (Zeiss) oder unter dem Olympus-IX81-Laser-Konfokalmikroskop betrachtet und mit Hilfe der dazugehörigen TissueQuest-Software (Tissue Gnostics) analysiert. Weitere Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. D. Anz, Abteilung für Klinische Pharmakologie, LMU München durchgeführt.

2.2.7 TUNEL-Färbung zum Nachweis freier dsDNA

Die TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated X-dUTP nick end labeling) dient dem Nachweis von apoptotischen Zellen in Geweben und Zellkulturen, indem es DNA-Strangbrüche markiert und sichtbar macht.

Hierfür wurden Paraffinschnitte von psoriatischer und gesunder Haut entparaffiniert, rehydriert und in Citrat-Puffer (10mM, pH 6; 29,41g Natriumcitrat in 1 Liter destilliertem H₂O, 21,01g Citrationsäure in 1 Liter destilliertem H₂O, 81ml Natriumcitrat +19ml Citrationsäure ad 1 Liter destilliertem H₂O) demaskiert. Als Positiv-Kontrolle dienten Schnitte, die vor der Färbung mit DNase I (50IU/ml; Invitrogen) behandelt

wurden. Die TUNEL-Reaktion wurde nach dem Herstellerprotokoll In-situ-Cell-Death-Detection-Kit von Roche durchgeführt. Zunächst wurden 100µl der Markierlösung für die Negativkontrollen entnommen und in ein separates Eppendorfcup überführt. Anschließend erfolgte die Herstellung der TUNEL-Reaktionsmischung, indem 50µl der Enzymlösung (Ampulle 1) zu den restlichen 450µl der Label-Lösung (Ampulle 2) gegeben wurden. Nach gutem Durchmischen wurden 50µl pro Probe dieses Reaktionsmixes auf die Schnitte gegeben, wobei für die Negativkontrollen 50µl der zuvor entnommenen Markierlösung verwendet wurden. Nun wurden die einzelnen Schnitte in einer feuchten Kammer für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Signalkonversion wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS-Lösung 50µl des Converter-AP (Anti-Fluorescein-Antikörper, Fab-Fragment vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase in Triethanolamin-gepufferter Lösung bei 2-8°C) auf die Slides gegeben und diese erneut in einer feuchten Kammer für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Hierauf wurden nach mehrmaligen Waschschritten mit PBS 100µl des SigmaFast-Red-TR/Naphthol-AS-MX-Alkaline-Phosphatase-Substrate-Tablets-Set (Sigma-Aldrich) für weitere 12 Minuten Inkubationszeit auf die Schnitte aufgetragen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

Die so angefärbten Paraffinschnitte wurden mit dem TissueFAXS-System-Mikroskop (TissueGnostics, Wien, Österreich) bei 100- bis 200-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert. Um die Intensität der TUNEL- und Hämatoxylin-Färbung zu quantifizieren, wurde HistoQuest-Software verwendet.

2.2.8 Präparation der Zytosolextrakte

Für die Präparation der Zytosolextrakte wurden die Keratinozyten, die zuvor mit BiotinTEG konjugierter dsDNA300 und/oder LL-37 für 24h inkubiert worden waren, mittels Trypsin von der Flasche gelöst, dreimalig mit PBS gewaschen und das Pellet in 50µl Digitonin-Puffer (200µg/ml in PBS) für 5 Minuten auf Eis inkubiert, wodurch eine Auflösung der Zellmembranen herbeigeführt wurde. Anschließend wurden die gewonnenen Lysate für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (1000g), was eine Auftrennung in Membranen, Nukleoli und Mitochondrien bewirkte. Der Überstand, der die

zytosolische Fraktion darstellte, wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und zur sicheren Entfernung von Zelldebris und Mitochondrien wiederum für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (1000g). Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der zytosolischen Fraktion erfolgte wie unter 2.2.4.2 beschrieben, wobei jeweils 10µg für das Immunoblotting eingesetzt wurden.

2.2.9 Isolierung der biotinylierten DNA und Bestimmung des DNA-gebundenen LL-37 (Dot Blot)

Die hergestellten Zytosolfractionen wurden mit Streptavidin-überzogenen Magneten (Dynabeads M-280 Streptavidin; Invitrogen) in PBS vermischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Beads-Zytosol-Gemisch in einem Magnethalter separiert und dabei das ungebundene Material (Flow-through) aufbewahrt. Nach viermaligem Waschen mit 0,1% BSA/0,05% Tween-20/PBS ließ man die Beads mit 0,1% SDS/PBS bei 100°C für 5 Minuten inkubieren, um so die DNA und assoziierte Proteine wieder von den Beads zu lösen. Mittels magnetischer Separation wurden die Beads nun aus dem Gemisch entfernt und zur Wiederverwendung in H₂O ad iniectabilia resuspendiert. Der ungebundene Überstand (Flow-through), der bei der ersten Separation im Magnethalter abgenommen und aufbewahrt worden war und das an die Beads gebundene Eluat, das nach Erhitzen und Separation der Beads im Magnethalter abgenommen werden konnte, wurden nun auf eine Nylon-Membran (Roche) aufgetragen. Nach einem Cross-linking der Membran mit UV wurde diese nun, um die freien Bindungsstellen zu blockieren, für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1% Western-Blocking-Reagent (Invitrogen) in TBS (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl (Sigma-Aldrich), pH 7,5) inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran mit einem HRP-konjugierten für Biotin- und hCAP18/LL-37-spezifischen Antikörper und den entsprechenden HRP-konjugierten Zweit-Antikörpern inkubiert. Dieser korrespondierende Zweit-Antikörper konnte nun mithilfe des Amersham-ECL-Plus-Western-Blot-Detection-System nachgewiesen werden.

2.2.10 Isolierung genomischer DNA (gDNA)

Primäre humane Keratinozyten (NHEK) wurden wie unter 2.1.2 beschrieben kultiviert. Bei einer Konfluenz von 85-95% wurde die gesamte genomische DNA (gDNA) mithilfe des quick-gDNA_{TM}MiniPrep-Kit (Zymo Research) aus den Keratinozyten isoliert.

2.2.11 Experimentelle Zerstörung der oberflächlichen Hautbarriere

Um eine oberflächliche Zerstörung der Hautbarriere hervorzurufen, wurde die „Tape-Stripping-Methode“ an einer standardisierten Fläche auf der Haut des Unterarms von gesunden Freiwilligen durchgeführt. Dabei wurde die Haut solange mit Tesafilmabrissen behandelt, um eine quantitative Entfernung des Stratum corneums zu bewirken, bis ein transepidermaler Wasserverlust von 40g/m²h erreicht war, gemessen mit dem Tewameter TM210 (Courage und Khazaka). Aus der Haut der Probanden wurden Biopsien vor der Durchführung des „Tape-Strippings“ und 24 Stunden nach der Behandlung entnommen und weitere Analysen durchgeführt.

2.2.12 Bestimmung der zellulären LL-37-Aufnahme

Um die Aufnahme von LL-37 in die Keratinozyten zu untersuchen, wurde Cathelicidin LL-37-Peptid mit Rhodamin mithilfe des Lightning-LinkTM-Rhodamine-Konjugation-Kit (Innova Biosciences) markiert.

Hierauf wurden unbehandelte oder mit siRNA vorbehandelte Keratinozyten mit LL-37-Rhodamin in einer Konzentration von 10µg/ml stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gelöst, dreimalig mit PBS gewaschen und in einem FACSCanto-Gerät mit entsprechender FACSDiva Software (BD) analysiert.

2.2.13 IL-1β ELISA

Die Konzentration des sezernierten IL-1β wurde mit einem Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) gemessen. Die Methode funktioniert nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch eine Enzym-katalysierte Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Die Farbintensität ist dabei direkt proportional zur

sezernierten Menge an IL-1 β (Antigenkonzentration). In allen Versuchen wurde das IL-1 β -ELISA-Duo-Set von R&D Systems verwendet.

Für den Start des ELISA-Versuchs wurde ein Capture-Antibody (mouse-anti-human-IL-1 β) mit PBS (Phosphate-Buffer-Saline, pH 7,2 - 7,4, sterilfiltriert) auf die Arbeitskonzentration von 4 μ g/ml verdünnt und auf die 96-Well-Mikroplatte (NUNC MaxiSorp Strips) mit jeweils 100 μ l pro Well aufgetragen. Im Anschluss daran wurden die einzelnen Kammern mit Parafilm fest verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine dreimalige Waschung der Platte mit 300 μ l PBS-T-Waschpuffer (PBS pH 7,2 - 7,4, 0,05% Tween 20 bei 4°C) pro Well. Für die anschließende Blockreaktion der Platte wurden 300 μ l Reagent-Diluent (PBS pH 7,2 - 7,4, 1% BSA (Sigma, Frakt.V), sterilfiltriert, bei 4%) pro Well aufgetragen, die Platte mit Parafilm verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und dreimaligem Waschen war nun der Auftrag der Standardverdünnungsreihe und Proben erforderlich. Für die Standardverdünnungsreihe mussten zuvor von einem Standard (Stockkonzentration = 100ng/ml) mithilfe von Reagent-Diluent Verdünnungen von 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,625; 1,8125 und 0 (reines Reagent-Diluent) pg/ml angefertigt werden, die dann in aufsteigender Reihenfolge mit je 100 μ l/Well aufgetragen wurden. In die darauffolgenden Kammern wurden die zu testenden, gut gemixten Proben ebenso mit 100 μ l/Well aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubationszeit und erneutem Waschen wurden 100 μ l Detektions-Antikörper (Stockkonzentration = 54 μ g/ml) in einer Konzentration von 300ng/ml pro Well hinzugefügt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 100 μ l/Well Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:200 in Reagent-Diluent, das eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten erforderte. Hierauf wurde die Platte ein letztes Mal mit PBS-T gewaschen und 100 μ l/Well einer TMB-Solution (42mM TMB in DMSO 8100,9mg/10ml, 0,1M Na-Acetat-Puffer pH 5,2 (4,1g/500 ml), 5ml TMB zu 500ml Na-Acetat-Puffer, bei 4°C, lichtgeschützt), die zuvor aus 10ml TMB-Solution und 2 μ l H₂O₂ angesetzt wurde, aufgetragen und so die enzymatische Farbreaktion gestartet. Nach ungefähr 25 Minuten Inkubationszeit, wobei die genaue Zeit von der Intensität der Färbung der Standards und Proben abhängig ist und von Versuch zu Versuch variiert, wurde die Farbreaktion durch

Zugabe von 50µl H₂SO₄ gestoppt. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung und Analyse der IL-1β-Konzentration bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Wellenlängenkorrektur von 570nm (oder 540nm) in einem vollautomatischen ELISA-Lesegerät.

2.2.14 Statistische Analyse

Alle statischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Zur Berechnung statistischer Unterschiede diente der Student's *t*-Test oder Mann-Whitney-Test. Die Auswertung der aus Patienten- und Probandenbiopsien gewonnenen Daten erfolgte mittels Wilcoxon-matched-pairs-Test. P<0,05 wurde als Signifikanzniveau angenommen und alle Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1 IL-1 β ist in psoriatischen Läsionen aktiviert

Das in entzündeter Haut in Psoriasis vorherrschende Milieu an Zytokinen besteht aus zahlreichen proinflammatorischen Mediatoren (5), unter welchen IL-1 β eine bedeutende Rolle als proinflammatorisches Signal einnimmt. Daher wurde zunächst mithilfe einer Polymerasekettenreaktion von aufbereiteten Hautbiopsien von läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut die relative pro-IL-1 β -Expression in den Biopsien untersucht. Dies erbrachte den Nachweis einer signifikant erhöhten Menge an IL-1 β -mRNA in den Biopsien läsionaler psoriatischer Haut (Abbildung 3).

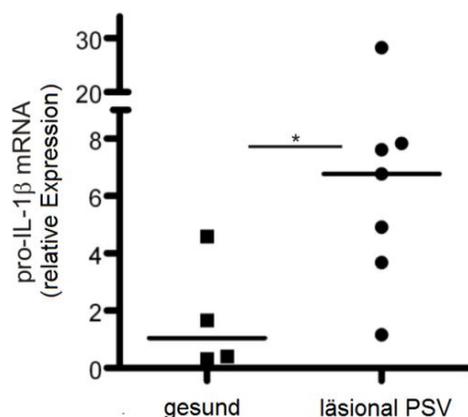


Abbildung 3: Expression von IL-1 β -mRNA (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) in Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis vulgaris (PSV) ($n = 7$) im Vergleich zu gesunden Spendern ($n = 4$; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten). * $P < 0.05$, Mann-Whitney-Test.

Wie zuvor beschrieben wird die proteolytische Aktivierung von IL-1 β durch Inflammasome reguliert. Bestimmte immunogene Stimuli führen zu Caspase-1-Aktivierung, welche wiederum die Spaltung und Aktivierung von IL-1 β bewirkt. Aus diesem Grund untersuchten wir in einem Western-Blot die Caspase-1- und IL-1 β -Expression in Proteinextrakten läsionaler versus gesunder Haut. Demzufolge war neben erhöhter IL-1 β -Expression auch erhöhte Aktivität von Caspase-1 in psoriatischen Läsionen im Vergleich zu nicht-läsionaler Haut zu finden (13) (Abbildung 4) .

Da eine sterile Verletzung, wie z.B. Entnahme einer Biopsie, bereits Inflammasomaktivierung hervorruft (71), ist aktive Caspase-1 auch in Biopsien nicht-entzündeter Haut zu finden. Dennoch waren in läsionaler psoriatischer Haut stärkere Caspase-1-Aktivität und größere Mengen an pro-IL-1 β nachzuweisen als in den Biopsien gesunder Haut, was für eine erhöhte Inflammasomaktivität in psoriatischen Hautarealen spricht (Abbildung 4).

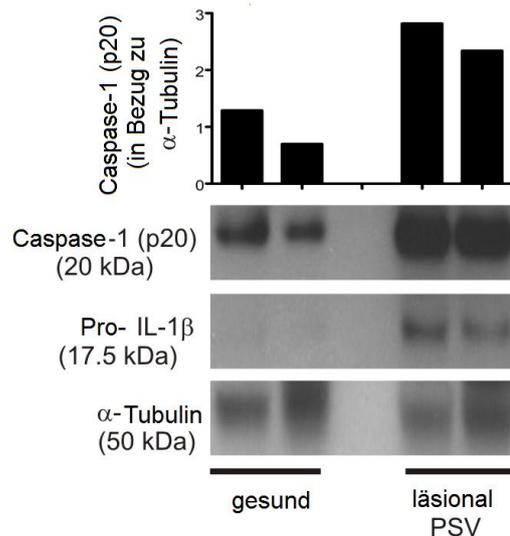


Abbildung 4: Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus Biopsien läsionaler psoriatischer Haut ($n = 2$) und Haut gesunder Spender ($n = 2$) mit spezifischen Antikörpern für aktive Caspase-1-Untereinheit p20 und pro-IL-1 β (untere Graphik). Die Caspase-1-p20-Proteinlevel wurden durch Densitometrie quantifiziert, während α -Tubulin als Kontrolle diente (obere Graphik).

3.2 Keratinozyten in psoriatischen Läsionen produzieren erhöhte Mengen an AIM2

Um nun schrittweise die Annahme zu prüfen, dass in Psoriasis zytosolische DNA das AIM2-Inflammasom in epidermalen Keratinozyten aktiviert und dies dann zur IL-1 β -Aktivierung führt, wurde zunächst die AIM2-mRNA-Menge in Hautproben gesunder Probanden, Biopsien läsionaler und nicht-läsionaler Haut psoriatischer Patienten untersucht. Signifikant erhöhte Mengen an AIM2-mRNA wurden in läsionaler Haut von Psoriasispatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert (Abbildung 5).

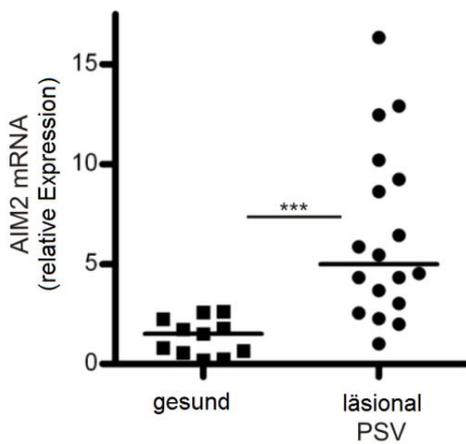


Abbildung 5: AIM2-mRNA-Expression (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) in Hautbiopsien von gesunden Spendern ($n = 11$) verglichen mit läSIONALER Haut von Patienten mit Psoriasis ($n = 18$). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, Mann-Whitney-Test.

Auch unter Psoriatikern war noch ein Unterschied zwischen von Psoriasis-betroffener und gesunder Haut festzustellen. Die AIM2-mRNA-Level waren signifikant höher in läSIONALER im Vergleich zu nicht-läSIONALER Haut (Abbildung 6).

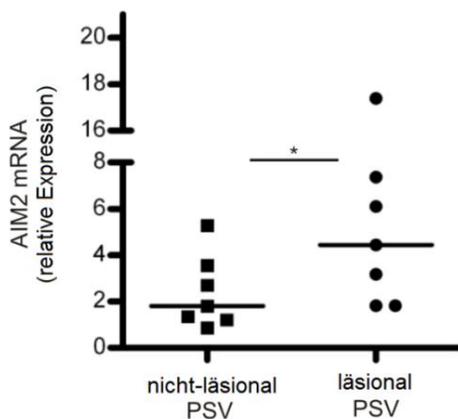


Abbildung 6: AIM2-mRNA-Expression (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) in Biopsien, die aus läSIONALER und nicht-läSIONALER Haut von Patienten mit Psoriasis entnommen wurden ($n = 7$). Wilcoxon matched-pairs-Test.

Um die AIM2-Menge in psoriatischen Läsionen auf Proteinebene zu bestimmen wurden histologische Schnitten von Biopsien von Haut gesunder Probanden versus

Biopsien von Haut dreier unterschiedlicher Patienten mit Psoriasis mit einem polyklonalen Antikörper für AIM2 inkubiert. Die anschließend durchgeführten TissueFAXS-Analysen zeigten einen deutlichen Anstieg des AIM2-Proteins in psoriatischen Läsionen verglichen mit gesundem Gewebe, wobei sich die apikale Keratinozytenschicht am stärksten positiv anfärbte (Abbildung 7).

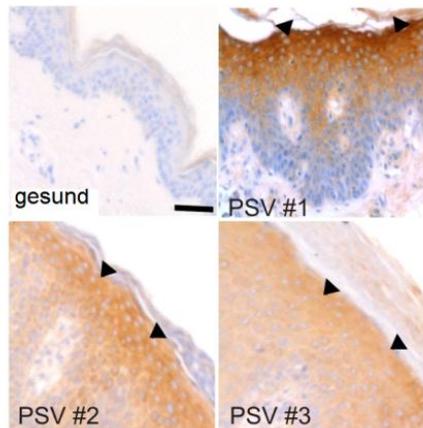


Abbildung 7: Bestimmung der AIM2-Proteinmenge durch immunhistochemische Färbungen in histologischen Schnitten von Biopsien gesunder Spender und läsionaler psoriatischer Haut ($n = 3$). Die Pfeilspitzen zeigen die apikale Keratinozytenschicht. Maßstabsbalken 20 μm , *gesund* versus *PSV #1- #3* (Psoriasis vulgaris Patient Nummer 1- 3).

Nachdem gezeigt worden war, dass in psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder Haut AIM2-mRNA und -Protein verstärkt exprimiert werden, war es nun von Interesse die Faktoren zu identifizieren, die das AIM2-Inflammasom in Psoriasis hochregulieren. Hierfür wurden die proinflammatorischen Zytokine, die typischerweise bei Psoriasis in erhöhter Konzentration zu finden sind ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und IL-17A) der Reihe nach getestet, indem primäre humane Keratinozyten jeweils für 24h mit eben diesen Zytokinen stimuliert wurden und im Anschluss daran die AIM2-mRNA-Expression gemessen wurde. Interferon- γ , das die Gene der HIN-200-Familie induziert, wozu auch AIM2 zählt, führte konzentrationsabhängig zu verstärkter AIM2-Expression in primären Keratinozyten, wohingegen $\text{TNF}\alpha$ und IL-17A keinen Effekt zeigten (72, 73) (Abbildung 8).

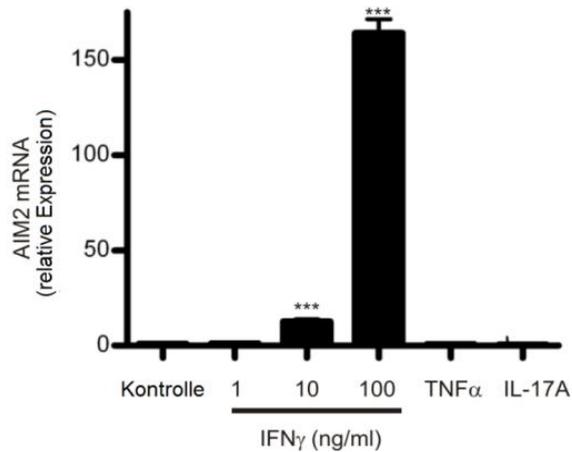


Abbildung 8: Primäre humane Keratinozyten wurden mit IFN γ , TNF α und IL-17A für 24h stimuliert und anschließend die AIM2-mRNA-Expression (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) quantifiziert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis). *** $P < 0.001$, Student's t -Test.

Zusätzlich sensibilisierte die Induktion der Zelldifferenzierung durch Calcium die Keratinozyten für die Stimulation mit IFN γ und führte so zu einer verstärkten Induktion der AIM2-Expression (Abbildung 9).

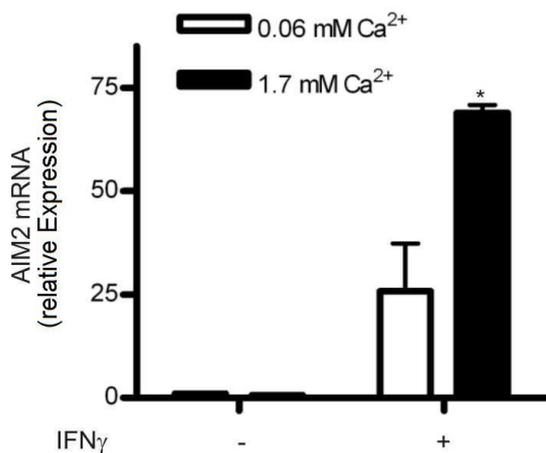


Abbildung 9: Primäre humane Keratinozyten wurden in einem Calcium in niedriger (0.06 mM) und hoher Konzentration (1.7 mM) enthaltenden Medium für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit IFN γ stimuliert und die AIM2-mRNA-Expression (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) mittels qPCR analysiert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 5; n bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Dementsprechend korrelierte die IFN γ - und AIM2-Expression in läsionaler psoriatischer Haut. $R^2 = 0.75$ (Abbildung 10).

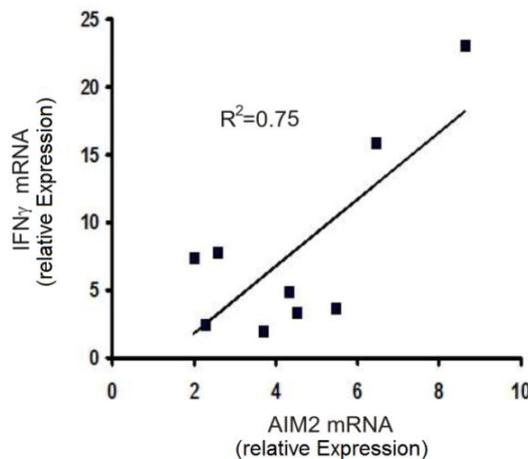


Abbildung 10: Korrelation von IFN γ - und AIM2-mRNA-Mengen (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) in läsionaler psoriatischer Haut ($n = 9$; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten) ($R^2 = 0.75$).

3.3 Zytosolische DNA induziert die IL-1 β -Ausschüttung in Keratinozyten über das AIM2-Inflammasom

Da nun bekannt war, dass IL-1 β und AIM2 in psoriatischen Läsionen hochreguliert sind, wurde in den folgenden Experimenten mit epidermalen Keratinozyten *in vitro* untersucht, ob zytosolische DNA die IL-1 β -Sekretion über ein AIM2-abhängiges Inflammasom aktiviert. Weder alleinige Stimulation mit TNF α oder IFN γ noch Transfektion von DNA (poly(dA:dT)) führten zu einem Anstieg der IL-1 β -Ausschüttung in den Keratinozyten. Im Gegensatz dazu zeigte die Transfektion von DNA in Zellen, die vorher mit TNF α und IFN γ stimuliert worden waren, einen vierfachen Anstieg der IL-1 β -Sekretion (Abbildung 11).

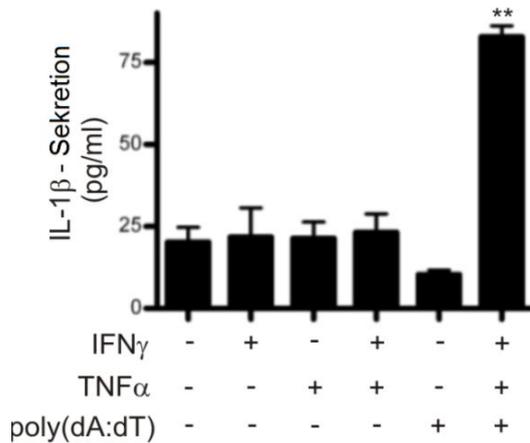


Abbildung 11: Primäre humane Keratinozyten wurden für 24 Stunden mit TNF α und IFN γ stimuliert und daraufhin mit poly(dA:dT) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die IL-1 β -Sekretion bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 5 ; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis). ** $P < 0.01$, Student's t -Test.

Um die Rolle der DNA bei der IL-1 β -Aktivierung genauer zu untersuchen, wurden Keratinozyten mit DNase, poly(dA:dT) und IFN γ /TNF α behandelt und anschließend die IL-1 β -Sekretion gemessen. Die Behandlung mit DNase vor der Stimulation mit IFN γ /TNF α führte zu einer Hemmung der IL-1 β -Aktivierung, was DNA als Trigger für die Aktivierung von IL-1 β vermuten lässt und die bedeutende Rolle zytosolischer DNA bestätigt (Abbildung 12).

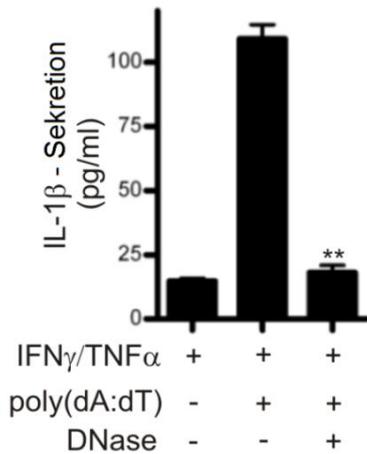


Abbildung 12: Primäre humane Keratinozyten wurden für 24 Stunden mit TNF α und IFN γ stimuliert und daraufhin mit poly(dA:dT) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die IL-1 β -Sekretion bestimmt. DNase-Behandlung von poly(dA:dT) vor der Transfektion mit poly(dA:dT) führte zu einer Hemmung der IL-1 β -Sekretion in den Zellen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 5 ; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis). **P < 0.01, Student's t -Test.

In einem weiteren Experiment wurde die Relevanz der Länge der DNA-Fragmente untersucht. Kürzere DNA-Fragmente induzierten eine stärkere IL-1 β -Sekretion in den Keratinozyten als längere Fragmente, die größte Reaktion verursachte jedoch isolierte genomische DNA, die eine Mischung aus DNAs verschiedener Länge darstellt (Abbildung 13).

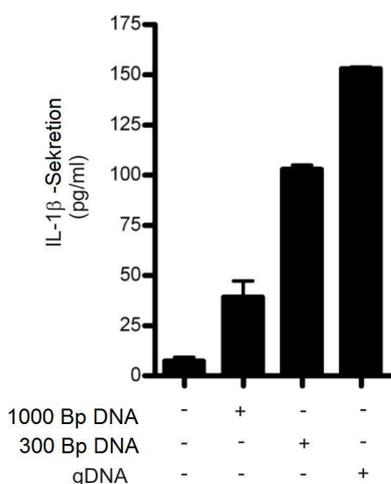


Abbildung 13: Primäre humane Keratinozyten wurden mit IFN γ und TNF α für 24 Stunden stimuliert und anschließend mit DNA von 1000 und 300 Basenpaaren Länge oder genomischer (g)DNA, die aus NHEK isoliert worden war, transfiziert. Mittels ELISA wurde die IL-1 β -Sekretion 24 Stunden später bestimmt.

Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Als weiteren Nachweis einer Inflammasomaktivierung wurde die Menge an sezernierter Caspase-1 in stimulierten Keratinozyten näher untersucht. In einer Western-Blot-Analyse von Lysaten und Überständen von Keratinozyten, die mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ stimuliert, anschließend mit poly(dA:dT) transfiziert und bei denen nach 24 Stunden die IL-1 β -Sekretion bestimmt wurde, zeigte sich, dass mit Zytokinen stimulierte Keratinozyten auch größere Mengen an aktiven Caspase-1-Untereinheiten (p20) als Reaktion auf zytosolische DNA sezernieren. Dies stellt wiederum einen Beweis für die Inflammasomaktivierung dar (Abbildung 14). Da Caspase-1 (Untereinheit p20) nicht nur für das AIM2-Inflammasom, sondern auch für andere Inflammasome zur Verfügung steht, ist es auch intrazellulär in den Ansätzen vorhanden, die nicht mit poly(dA:dT) transfiziert wurden. Erst eine Sekretion von Caspase-1 weist auf eine Inflammasomaktivierung hin.

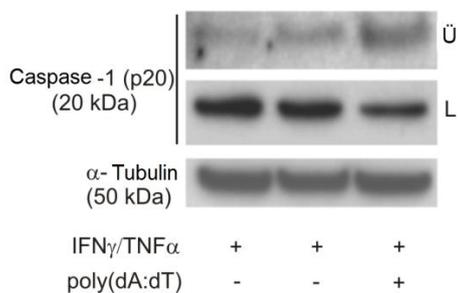


Abbildung 14: Western-Blot-Analysen zeigen aktive Caspase-1 (Untereinheit p20) in Lysaten (L) und Überständen (Ü) von Keratinozyten, die zuvor - wie unter Abbildung 12 beschrieben - behandelt wurden ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Als Bestätigung der Annahme, dass AIM2 an der DNA-abhängigen IL-1 β -Sekretion in Keratinozyten beteiligt ist und um die bedeutende Rolle des AIM2-Inflammasoms als Reaktion der Keratinozyten auf zytosolische DNA zu demonstrieren, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem AIM2 durch spezielle RNAs ausgeschaltet wurde.

Zwei „small-interfering-RNAs“ (siRNAs) wurden eingesetzt und führten zu einer wirksamen Herabregulation der AIM2-Expression (Abbildung 15). Eine unspezifische Kontroll-siRNA diente als Kontrolle.

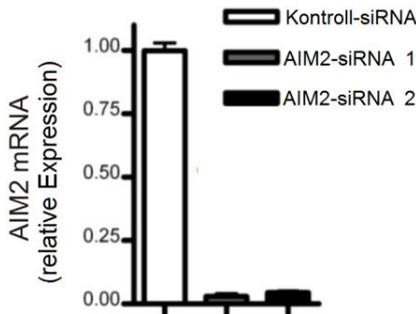


Abbildung 15: Primäre humane Keratinozyten wurden mit AIM2-spezifischer oder Kontroll-siRNA transfiziert und 24 Stunden später die AIM2-mRNA-Expression (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) in diesen Zellen gemessen ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Das folgende Ergebnis zeigt, dass ein Ausschalten von AIM2 in einer kompletten Hemmung der IL-1 β -Ausschüttung als Reaktion der Keratinozyten auf poly(dA:dT) resultiert (Abbildung 16). Dies beweist die entscheidende Funktion des AIM2-Inflammasoms in der Reaktion von Keratinozyten auf DNA im Zytosol.

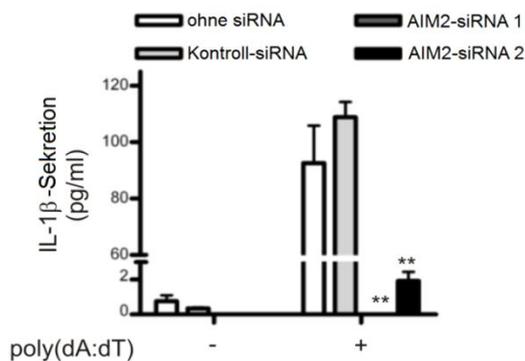


Abbildung 16: Mit TNF α /IFN γ stimulierte primäre humane Keratinozyten wurden mit zwei unterschiedlichen AIM2-spezifischen siRNAs oder einer Kontroll-siRNA stimuliert und anschließend poly(dA:dT) zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die IL-1 β -Ausschüttung bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 5 ; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis). ** $P < 0.01$, Student's t -Test.

Bemerkenswert an unserem Experiment ist auch, dass die AIM2-abhängige IL-1 β -Aktivierung die Stimulation sowohl mit IFN γ , was die AIM2-Expression erhöht, als auch mit TNF α , welches einen Anstieg von pro-IL-1 β vergleichbar mit IL-17A in Keratinozyten bewirkt, benötigt (Abbildung 17). Neuere Untersuchungen inzwischen zeigen jedoch, dass in Keratinozyten ausreichend pro-IL1 β auch ohne Stimulation mit TNF α vorhanden ist.

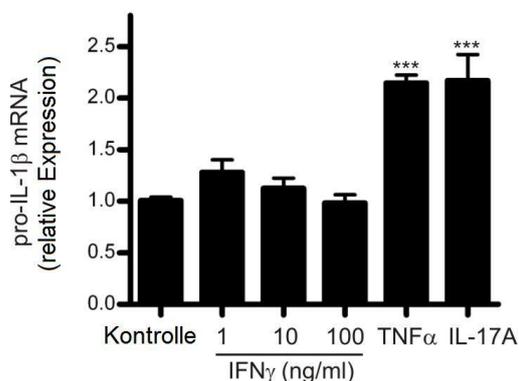


Abbildung 17: NHEK wurden für 24 Stunden mit IFN γ (1-100ng/ml), TNF α und IL-17A stimuliert und anschließend die relative pro-IL-1 β -mRNA quantifiziert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 5 ; n bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis) *** $P < 0.001$; Student's t -Test.

Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass das spezielle proinflammatorische Milieu, das in läsionaler psoriatischer Haut vorherrscht, ein essenzielles Element für die AIM2-abhängige Inflammassomaktivierung in Keratinozyten darstellt.

3.4 Zytosolische DNA ist in Keratinozyten in psoriatischen Läsionen *in vivo* vorhanden

Die Aktivierung des AIM2-Inflammassoms erfordert die Anwesenheit von DNA im Zytosol als Trigger der Reaktion (64). Nachdem nun *in vitro* dargestellt wurde, dass IL-1 β in Psoriasis AIM2-vermittelt sezerniert wird, war es nun das Ziel den Trigger für AIM2 *in vivo* - welcher ja Doppelstrang-DNA sein sollte - zu identifizieren, weshalb im

folgenden Experiment Paraffinschnitte entnommener Hautbiopsien mit einer TUNEL-Färbung behandelt wurden. Hierbei wurden DNA-Fragmente im Zytosol der Keratinozyten läsionaler Haut der getesteten Psoriasispatienten (drei von drei Patienten), gefunden, jedoch weder in Schnitten gesunder Haut (Abbildungen 18 und 19) noch bei Patienten mit atopischer Dermatitis (Abbildung 20).

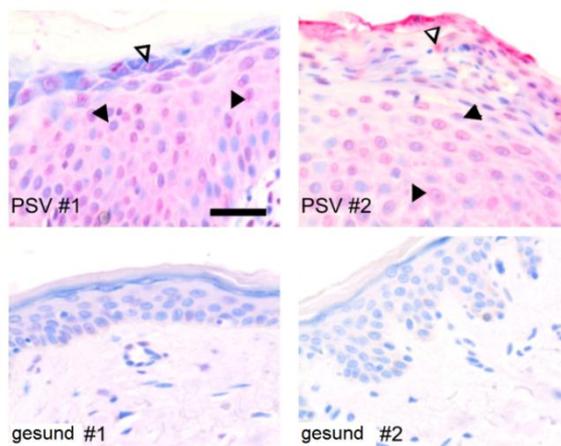


Abbildung 18: Nachweis von zytosolischen DNA-Fragmenten durch eine TUNEL-Färbung von psoriatischen Läsionen ($n = 3$) und Haut gesunder Kontrollen ($n = 2$). Mit DNase-I-behandeltes Gewebe diente als positive Kontrolle. Schwarze Pfeilspitzen zeigen auf zytosolische DNA in den Keratinozyten; weiße Dreiecke stellen nukleäre DNA dar. Maßstabsbalken 20 μm ; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten.

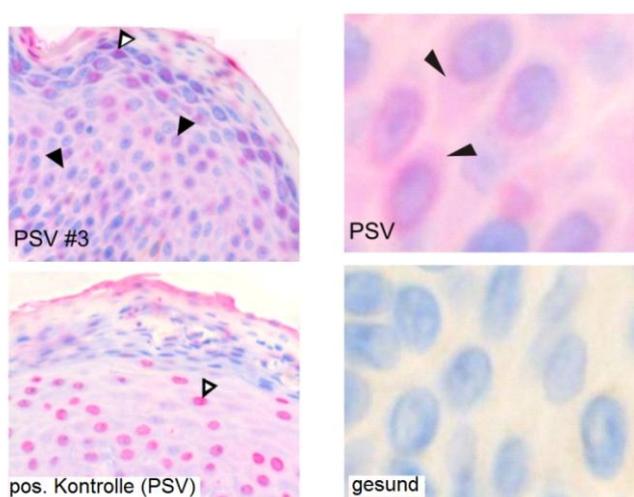


Abbildung 19: Zytosolische DNA-Fragmente nachgewiesen durch eine TUNEL-Färbung (siehe Abbildung 18) in stärkerer Vergrößerung. Schwarze Pfeilspitzen zeigen auf zytosolische DNA in den Keratinozyten.

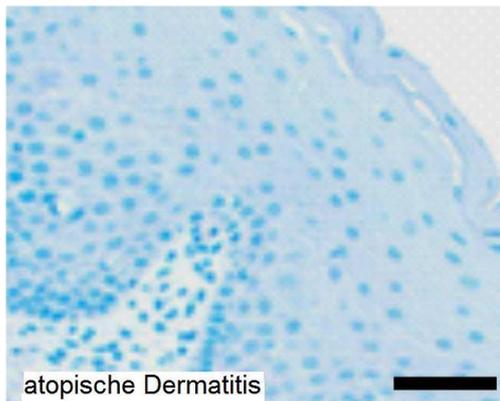


Abbildung 20: Die Abbildung zeigt eine TUNEL-Färbung von läSIONaler Haut eines repräsentativen Patienten mit atopischer Dermatitis ($n = 1$; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten). Maßstabsbalken 20 µm.

Eine TissueFAXS-Quantifizierung zeigte, dass sich in psoriatischer Haut mehr als 80% der Zellen positiv für zytosolische DNA anfärbten, während in gesunder Haut überhaupt keine DNA-Fragmente detektierbar waren (Abbildung 21).

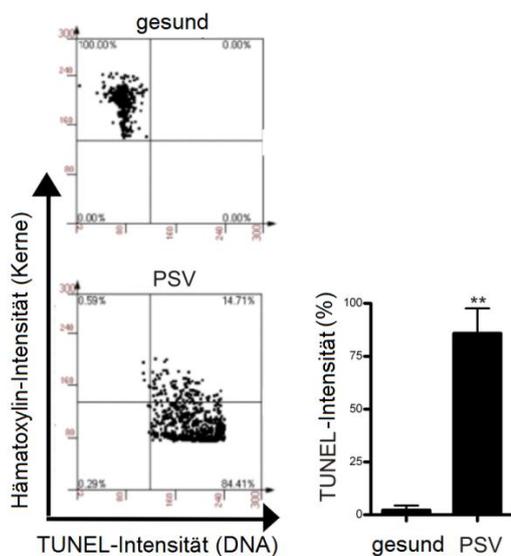


Abbildung 21: TissueFAXS-Quantifizierung der Färbungsintensität der TUNEL-Färbung von histologischen Schnitten psoriatischer Läsionen und gesunden Kontrollen. Abgebildet ist die Hämatoxylin-Färbung für die Kerne (y-Achse) aufgetragen gegen die TUNEL-Färbung für zytosolische DNA-Fragmente (x-Achse). Die Farbintensität wurde mit HistoQuest Software (Tissue Gnostics) mit bestimmten Farben für nukleäre Färbung (Hämatoxylin) und TUNEL-Färbung (FastRed) in Bezug zu TUNEL-negativen gesunden Kontrollen quantifiziert. Repräsentatives Beispiel (linke Graphik) und zusammengefasst in Graphdarstellung (rechte Graphik) ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten). $**P = 0.002$.

Die durchaus große Menge an positiv gefärbten Keratinozyten legt die Vermutung nahe, dass zytosolische DNA ein wichtiges krankheits-assoziiertes molekulares Muster in Psoriasis darstellt, das eine Entzündungsreaktion bewirken kann.

3.5 Das antimikrobielle Cathelicidin Peptid LL-37 vermindert die AIM2-abhängige IL-1 β Sekretion durch Bindung an zytosolische DNA

Die Anwesenheit von DNA im Zytosol von Keratinozyten stellt eine überraschende Entdeckung dar, doch die dieser Beobachtung zugrunde liegenden Mechanismen sind bis jetzt noch unbekannt. Durch oberflächliche Verletzung der äußersten Hautschichten mittels der „Tape-Stripping-Methode“ und TUNEL-Färbungen vor und 24h nach dem Tape-Stripping konnte experimentell die Anwesenheit von DNA im Zytosol epidermaler Keratinozyten gesunder Haut provoziert und nachgewiesen werden (Abbildung 22).

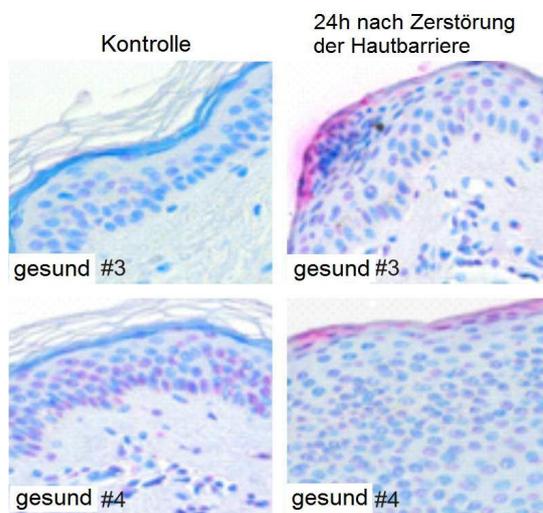


Abbildung 22: An gesunden, freiwilligen Probanden wurde die „Tape-Stripping-Methode“ durchgeführt, bei der die Haut am Unterarm mit Tesafilmabrissen solange behandelt wurde bis ein transepidermaler Wasserverlust von 40 g/m²h erreicht worden war. Anschließend wurden TUNEL-Färbungen der Haut vor und 24 Stunden nach dem „Tape-Stripping“ durchgeführt. Die schwarzen Pfeile zeigen die zytosolische DNA in den Keratinozyten ($n = 2$; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten).

In einem weiteren Versuch wurde mittels PCR die Cathelicidin-Expression in Biopsien läsionaler Haut verglichen mit Haut gesunder Kontrollen betrachtet. Es gibt Hinweise

dafür, dass das kationische antimikrobielle Peptid Cathelicidin LL-37, das in entzündeter psoriatischer Haut verstärkt exprimiert wird (45, 74) (Abbildung 23), die Aufnahme von DNA in die Zelle vermitteln kann (45, 75).

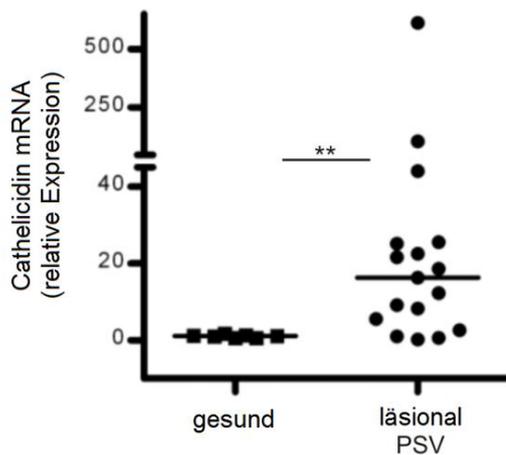


Abbildung 23: Cathelicidin-mRNA-Expression (relative Expression bzgl. Expression in gesunder Haut) in läsionaler Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris ($n = 17$) und in Haut gesunder Kontrollen ($n = 7$; n bezieht sich auf die Anzahl untersuchter Patienten). $**P < 0.01$, Mann-Whitney-Test.

In Übereinstimmung mit früheren Publikationen konnten wir in einem Western-Blot von Proteinextrakten gesunder versus läsionaler psoriatischer Haut auch reifes Cathelicidin LL-37-Peptid in läsionaler psoriatischer Haut in erhöhter Konzentration nachweisen (Abbildung 24).

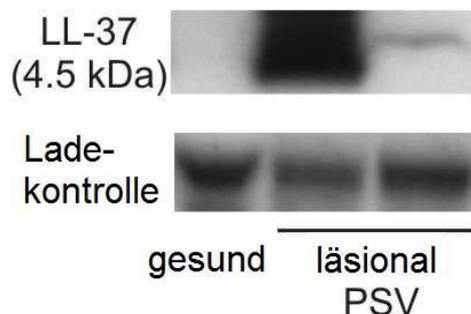


Abbildung 24: Die dargestellte Abbildung zeigt eine Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus Biopsien läsionaler psoriatischer Haut und gesunden Kontrollen, bei der ein spezifischer Antikörper für Cathelicidin LL-37 eingesetzt wurde.

Um nun aber genauer zu untersuchen, welche Rolle LL-37 in der AIM2-abhängigen IL-1 β -Reaktion einnimmt, waren weitere Experimente notwendig. Zunächst einmal wurde untersucht, ob LL-37 die Aufnahme von DNA in Keratinozyten vermittelt. Hierfür wurden primäre humane Keratinozyten mit Biotin-markierter DNA und LL-37 behandelt und daraus die zytosolischen Fraktionen isoliert. Anschließend wurden LL-37 und biotinylierte DNA mithilfe eines Immunodot-Blots in den zytosolischen Fraktionen detektiert. Dabei ergab sich, - die Vermutung bestätigend - dass sowohl LL-37 als auch die DNA anschließend im zytosolischen Kompartiment detektiert werden konnten (Abbildung 25), so dass ein Transport von DNA mittels LL-37 ins Zytosol stattgefunden haben muss, da Biotin-DNA ohne Behandlung mit LL-37 keine Detektion von Biotin-DNA in der zytosolischen Fraktion bewirkt hat.

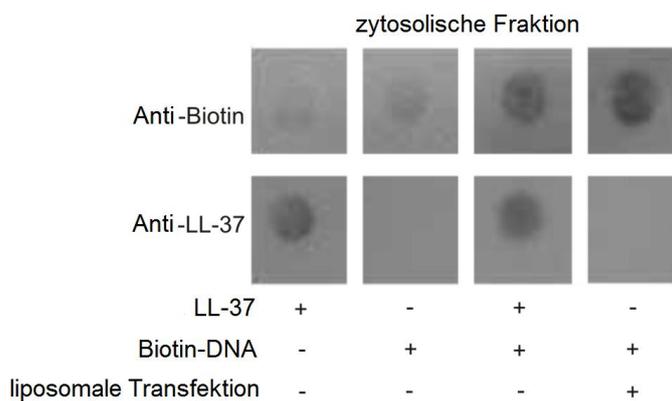


Abbildung 25: Primäre humane Keratinozyten wurden mit biotinylierter DNA und LL-37 behandelt und daraus zytosolische Fraktionen isoliert. Anschließend wurden LL-37 und biotinylierte DNA mithilfe eines Immunodot-Blots detektiert ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Anhand dieser Daten könnte LL-37 also als ein proinflammatorischer Faktor in Psoriasis angesehen werden, der die Aufnahme von Eigen-DNA in Keratinozyten bewirkt, was erhöhte IL-1 β -Produktion zur Folge haben könnte.

Ob diese These nun richtig ist und die LL-37-vermittelte DNA-Aufnahme an der Entstehung der entzündlichen Reaktion der Haut beteiligt ist und zur Bildung des Inflammasomkomplexes führt, wurde in einem weiteren Experiment geprüft. Hierfür

wurde DNA zusammen mit LL-37 zu Zellen gegeben und anschließend die IL-1 β -Sekretion bestimmt. Überraschenderweise konnten nur geringe Mengen an IL-1 β gemessen werden (Abbildung 26).

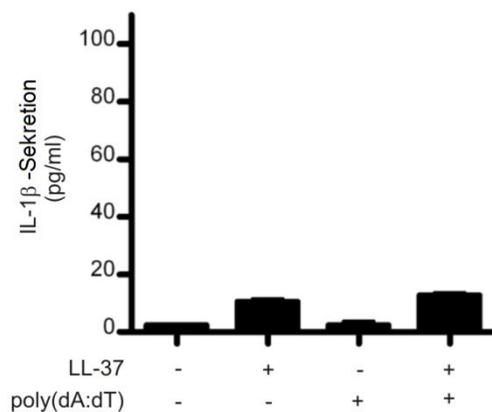


Abbildung 26: Mit TNF α /IFN γ stimulierte Keratinozyten wurden für 24 Stunden mit poly(dA:dT) und LL-37 (10 μ g/ml) inkubiert und daraufhin die IL-1 β -Sekretion gemessen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 6 ; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Hieraus ergibt sich, dass LL-37 zwar in der Lage ist, DNA ins Zytosol zu transportieren, aber diese durch LL-37 transportierte zytosolische DNA das AIM2-Inflammasom nicht mehr aktivieren kann.

3.6 LL-37 bindet an DNA im Zytosol und verhindert so die AIM2-Inflammasombildung

LL-37 scheint also als physiologischer Inhibitor der DNA-abhängigen Inflammasomaktivierung zu fungieren. Diese Entdeckung ist sehr erstaunlich und bemerkenswert, da LL-37 erst kürzlich als proinflammatorisches Signal in Psoriasis identifiziert wurde: Darin wurde beschrieben, dass LL-37, in einem Komplex mit Eigen-DNA aus untergehenden Zellen, in plasmazytoiden dendritischen Zellen über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptor 9 eine inflammatorischen Kaskade initiiert, die verstärkte Interferonproduktion hervorruft (45). Diese Tatsache in Kombination mit

unserem Ergebnis ergibt also, dass die Komplexe aus LL-37 und DNA, obwohl sie für den Signalweg über TLR9 notwendig sind und diesen aktivieren, dennoch nicht von AIM2 erkannt werden.

Um diese Annahme nun zu untersuchen, wurde in einem weiteren Experiment der Effekt von DNA genauer betrachtet, die mithilfe von Liposomen, durch die sichergestellt wurde, dass die DNA in die Zelle gelangt, aber keinen Komplex mit LL-37 eingeht, in die Zellen transfiziert wurde. Auch hier bewirkte die Zugabe von LL-37 eine Verminderung der IL-1 β -Sekretion, was auf eine inhibitorische Aktivität innerhalb der Zelle schließen lässt (Abbildung 27).

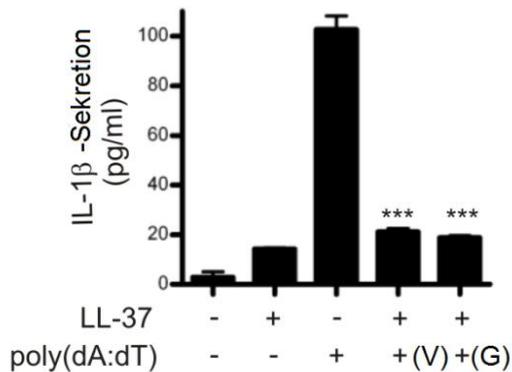


Abbildung 27: Mit TNF α /IFN γ stimulierte Keratinozyten wurden mit liposomal-komplexiertem poly(dA:dT) in Anwesenheit und Abwesenheit von LL-37 (10 μ g/ml) transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die IL-1 β -Sekretion gemessen. LL-37 wurde entweder gleichzeitig mit liposomal-komplexierter DNA (G) zugegeben oder für zwei Stunden vor der liposomalen Komplexierung mit der DNA vorinkubiert (V) und daraufhin zugegeben. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 6 ; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis). *** $P < 0.001$, Student's t -Test.

Dabei machte es keinen Unterschied, ob die DNA gleichzeitig mit LL-37 oder LL-37 und die DNA vorinkubiert im Komplex zugegeben wurden. Als Beweis dafür, dass liposomale Transfektion von poly(dA:dT) dem LL-37 vermittelten Uptake von DNA gleichzusetzen ist und LL-37 den liposomalen Transport nicht beeinflusst, diente eine FACS-Analyse, in der die Aufnahme von FITC-markierter DNA ins Zytosol bestimmt wurde.

Abbildung 28 zeigt, dass die Anzahl an Zellen, die die FITC-markierte DNA aufnehmen, nach Behandlung mit LL-37 (1-10µg/ml; mit oder ohne liposomale Transfektion) und nach liposomaler Transfektion ohne LL-37 ähnlich war. Die Reduktion der IL-1β-Ausschüttung in Anwesenheit von LL-37 ist also nicht durch unterschiedliche Mengen an aufgenommener DNA zu erklären.

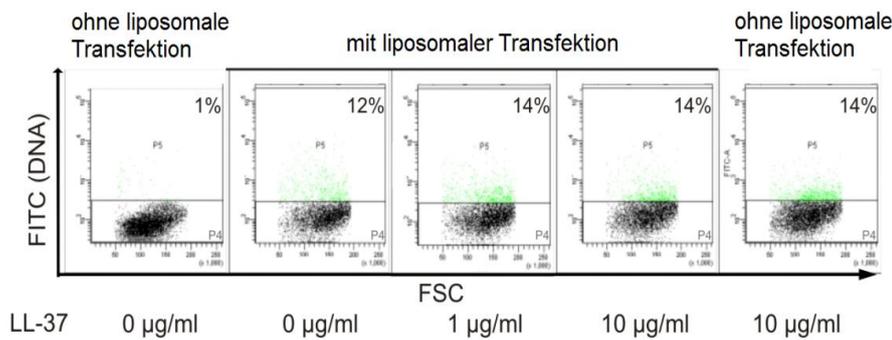


Abbildung 28: Keratinozyten wurden mit FITC-markierter DNA und LL-37 mit oder ohne liposomale Komplexierung - wie in Abbildung 27 beschrieben - behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung wurde die DNA-Aufnahme durch eine Flow-Zytometrie quantifiziert ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Um nun sichtbar und verständlich zu machen, dass LL-37 die DNA-getriggerte Formation des AIM2-Inflammasoms blockiert, wurde eine konfokalmikroskopische Betrachtung von CFP-ASC-exprimierenden Makrophagen durchgeführt. Wie oben erwähnt erfordert die Komplexbildung und Aktivierung des AIM2-Inflammasoms das Bindeprotein ASC, das nach seiner Aktivierung durch zytosolische DNA große Komplexe im Zytosol bildet (76). So ergibt sich, dass CFP-ASC-exprimierende Makrophagen hell grün fluoreszierende Gebilde aus CFP-ASC als Reaktion auf DNA im Zytosol bilden (Abbildung 29).

Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Cathelicidin LL-37 zu einer Auflösung der DNA-vermittelten Bildung des ASC-enhaltenden Inflammasomkomplexes in den Makrophagen (Abbildung 29).

Um die genaue Lokalisation des LL-37-Peptids innerhalb der Zelle nachvollziehen zu können, wurden die Zellen mit DNA und Rhodamin-markiertem LL-37 behandelt. Die

rechte Spalte der Abbildung 29 zeigt, dass LL-37 nach dieser Behandlung nun im Zytosol der Zellen zu sehen ist.

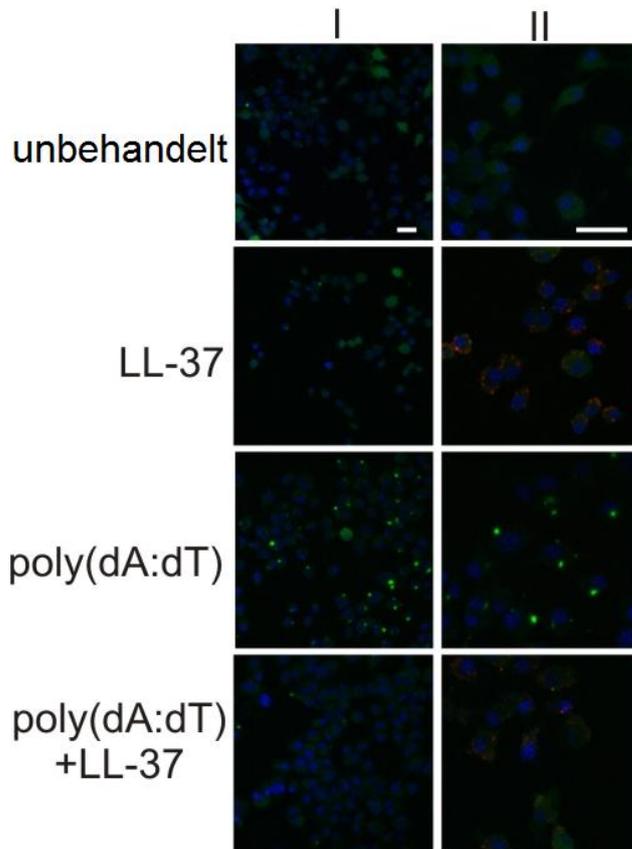


Abbildung 29: Eine konfokalmikroskopische Darstellung von CFP-ASC-exprimierenden Makrophagen, die die Inflammasomaktivierung zeigt. Die CFP-ASC-exprimierenden Makrophagen bilden große zytoplasmatische ASC-enhaltende Oligomere als Reaktion auf zytosolische DNA. Die Veränderungen in der zytoplasmatischen Fluoreszenz als Reaktion auf poly(dA:dT) wurden durch LL-37 inhibiert (linke Spalte I). In der rechten Spalte II, die eine höhere Vergrößerung zeigt, wurden die Zellen mit Rhodamin-markiertem LL-37 behandelt, um die intrazelluläre Lokalisation von LL-37 zu bestimmen. Maßstabsbalken 25µm. ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Da auch das D-Enantiomer von LL-37 (dLL-37) einen ähnlich hemmenden Effekt auf die IL-1 β -Ausschüttung zeigte, ist es denkbar, dass diese Eigenschaft der beiden LL-37-Peptide, die IL-1 β -Sekretion zu blocken, auf ihre kationischen Ladung und der sich daraus ergebenden Bindung an die negativ-geladene DNA zurückzuführen ist (Abbildung 30).

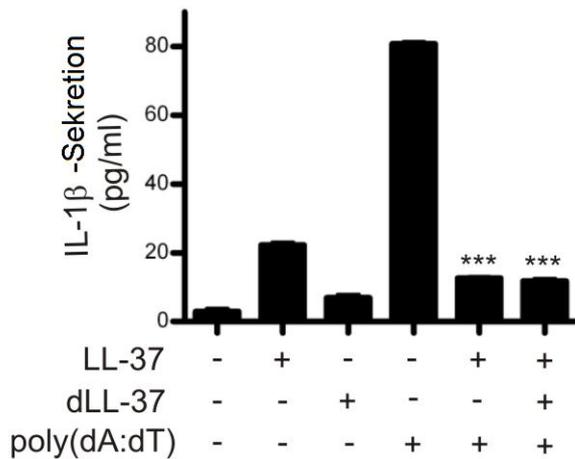


Abbildung 30: Mit $\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$ stimulierte Keratinozyten wurden mit DNA in An- und Abwesenheit von LL-37 und seinem D-Enantiomer (dLL-37) für 24 Stunden transfiziert und anschließend die IL-1 β -Sekretion bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$ bis 5 ; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis). *** $P < 0.001$, Student's t -Test.

Auch kleinere Cathelicidin-Peptid-Fragmente wie FA-29 und KS-30 verursachten einen ähnlichen Effekt, während andere antimikrobielle Peptide, wie S100A7 und S100A15, die auch an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sind, keine blockierende Wirkung zeigten (Abbildung 31). Als Ursache hierfür wäre die kationische Ladung von LL-37 und die daraus sich ergebende Bindung an die negative geladenen DNA denkbar, die dann zu einer Blockierung der IL-1 β -Sekretion führt.

Anhand von Keratinozyten, die mit poly(dA:dT), DNA-Fragmenten von 1000 und 300 Basenpaaren Länge (alle in einer Konzentration von 250ng/ml) und genomischer (g)DNA (100ng/ml) transfiziert wurden und bei denen 24 Stunden später die IL-1 β -Sekretion mittels ELISA bestimmt wurde, wurde ergänzend gezeigt, dass Cathelicidin LL-37 die IL-1 β -Sekretion unabhängig von der Länge der zytosolischen DNA immer signifikant hemmte (Abbildung 32).

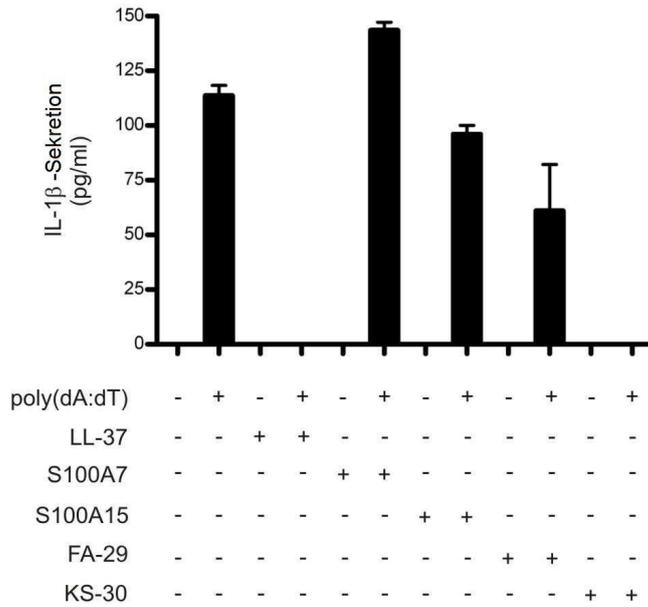


Abbildung 31: NHEK wurden mit poly(dA:dT) und Cathelicidin LL-37, S100A7 (in einem Komplex mit 100nM ZnCl₂), S100A15 oder den Cathelicidin-Peptiden FA-29 und KS-30 (alle in einer Konzentration von 10µg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die IL-1β-Sekretion mittels ELISA bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten ±SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel (*n* = 3; *n* bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis). ****P* < 0.001; Student's *t*-Test.

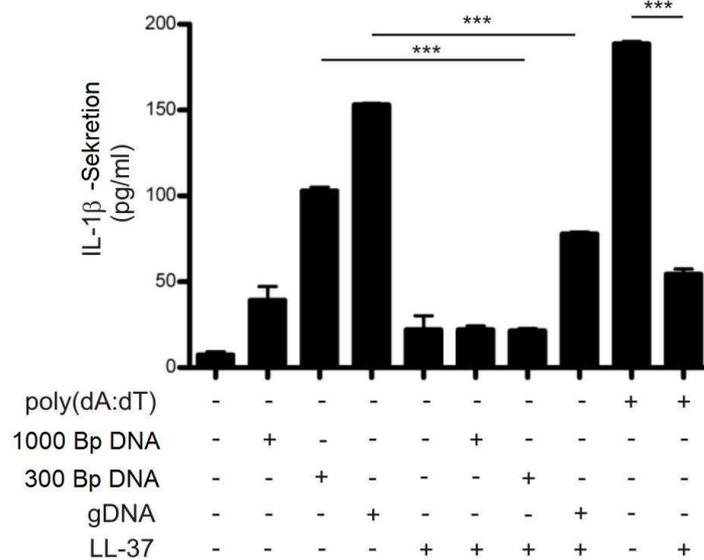


Abbildung 32: Primäre humane Keratinozyten wurden mit poly(dA:dT), DNA-Fragmenten von 1000 und 300 Basenpaaren Länge (alle in einer Konzentration von 250ng/ml) und genomischer (g)DNA (100ng/ml) transfiziert. IL-1β-Sekretion wurde 24 Stunden später mittels ELISA bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten ±SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel (*n* = 3; *n* bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Als nächster Schritt war jetzt noch von Interesse, wie sich Cathelicidin LL-37 und zytosolische DNA im Zytosol miteinander verhalten. Hierfür wurden Keratinozyten, die mit Rhodamin-markiertem LL-37 und FITC-markierter DNA behandelt wurden, unter einem konfokalen Mikroskop betrachtet. Dabei war eine Überlappung der Fluoreszenzen „rot“ (Rhodamin-markiertes LL-37) und „grün“ (FITC-DNA) sichtbar, was auf eine Kolokalisation zwischen DNA und LL-37 im Zytosol schließen lässt (Abbildung 33).

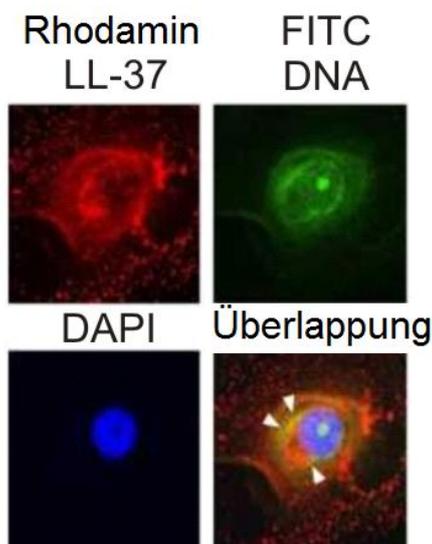


Abbildung 33: Primäre humane Keratinozyten wurden mit FITC-markierter DNA und Rhodamin-markiertem LL-37 für 24 Stunden behandelt und unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl der durchgeführten Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

In einem weiteren Versuch zur Untersuchung der Beziehung zwischen LL-37 und DNA, wurde mit Biotin markierte DNA zusammen mit LL-37 zu Keratinozyten gegeben und zytosolische Extrakte aus eben diesen Zellen angefertigt. Mittels Streptavidin-überzogener Beads, die eine hohe Affinität zu Biotin-markierten Molekülen aufweisen, konnte die mit Biotin markierte DNA in den Extrakten erfasst werden. Dabei war LL-37 auch in der erfassten Fraktion nachweisbar, was einen Beweis dafür darstellt, dass LL-37 und DNA im Zytosol nicht nur kolokalisieren, sondern auch direkt miteinander interagieren (Abbildung 34).

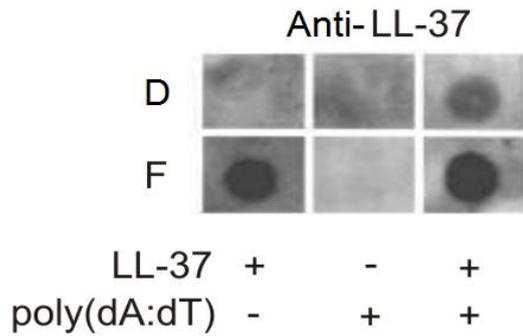


Abbildung 34: Keratinozyten wurden für 24 Stunden mit biotinylierter DNA und LL-37 inkubiert und daraus anschließend zytosolische Fraktionen hergestellt. Biotinylierte DNA wurde in den zytosolischen Fraktionen mithilfe von Streptavidin-überzogener magnetischer Beads erfasst. Die durch die Beads erfasste Fraktion E (Eluat, DNA bindend) und der Überstand D (Durchfluss, nicht DNA-bindend) wurden auf LL-37 hin durch einen Immunodot-Blot analysiert ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Anzumerken ist hierbei, dass der Transfer von LL-37 ins Zytosol der Keratinozyten unabhängig von Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. P2X7, ablief, für den in der Vergangenheit bereits gezeigt worden war, mit LL-37 zu interagieren (37) (Abbildung 35).

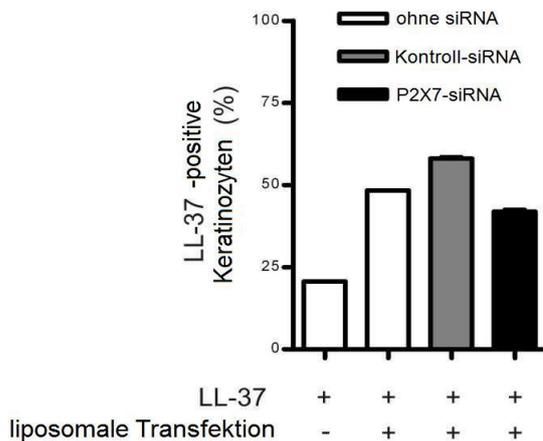


Abbildung 35: NHEK wurden hierfür entweder unbehandelt gelassen oder mit Kontroll-siRNA oder einer 1:1-Mischung aus zwei für die P2X7-Isoformen A-J spezifischen siRNAs für 48 Stunden transfiziert. Die Aufnahme des mit Rhodamin-markierten LL-37 durch die Keratinozyten wurde 24 Stunden später mittels FACS analysiert. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; die Daten sind in Mittelwerten aus Triplikaten \pm SD dargestellt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel ($n = 3$; n bezieht sich auf die Anzahl durchgeführter Experimente mit ähnlichem Ergebnis).

Eine Zusammenfassung der letzten Ergebnisse zeigt LL-37 als einen physiologischen Inhibitor des AIM2-Inflammasoms in Keratinozyten. Es bindet an DNA innerhalb der Zellen, was die Erkennung der DNA durch das AIM2-Inflammasom verhindert. Daraus ergibt sich, dass die DNA-abhängige Inflammasombildung nicht mehr funktioniert und die IL-1 β -Sekretion blockiert wird (siehe Abbildung 36) (70).

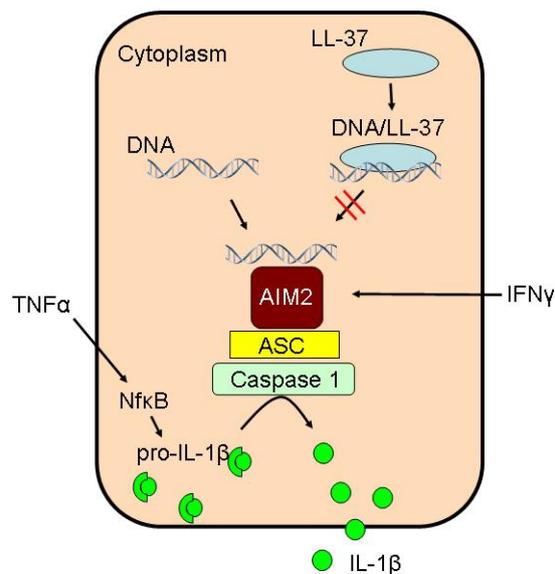


Abbildung 36: Eine schematische Zusammenfassung zeigt LL-37 als Inhibitor des AIM2-Inflammasoms in Keratinozyten. Es bindet an DNA innerhalb der Zellen, was die Erkennung der DNA durch das AIM2-Inflammasom verhindert. So funktioniert die DNA-abhängige Inflammasombildung nicht mehr und die IL-1 β -Sekretion wird blockiert (70).

4. Diskussion

Psoriasis ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Haut, bei welcher IL-1 β eine zentrale Rolle einnimmt. Posttranskriptionale Aktivierung von IL-1 β wird durch Inflammasome vermittelt, welche in Psoriasis aktiviert sind (13), wobei die das Inflammasom aktivierenden Mechanismen in Psoriasis noch nicht bekannt sind. Wir konnten in den oben dargestellten Experimenten zeigen, dass pro-IL-1 β , AIM2 und Caspase-1 in Psoriasis hochreguliert sind und das Inflammasom aktiviert ist. Außerdem wurde gezeigt, dass zytosolische DNA und erhöhte Mengen an AIM2 in Keratinozyten psoriatischer Läsionen, jedoch nicht in gesunder Haut zu finden sind. Zytosolische DNA ist ein wichtiges molekulares Muster, das in Psoriasis zur IL-1 β -Aktivierung über das AIM2-Inflammasom führt. Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin bildet mit zytosolischer DNA Komplexe, die ins Zytoplasma der Keratinozyten aufgenommen werden. LL-37 bindet direkt an zytosolische DNA und neutralisiert so ihren proinflammatorischen Effekt, indem es zu einer Verminderung der AIM2-Inflammasomaktivierung führt (70).

4.1 Ein aktives AIM2-Inflammasom in Psoriasis

In Untersuchungen von Biopsien läsionaler psoriatischer Haut und der Haut gesunder Kontrollen, die angefertigt wurden, um die Aktivität des AIM2-Inflammasoms in Psoriasis genauer zu betrachten, konnte gezeigt werden, dass in PSV eine erhöhte Expression des zytosolischen DNA-Sensors AIM2 und erhöhte Aktivität des Inflammasoms in Psoriasis vorliegt, was aus der erhöhten Expression von pro-IL-1 β , Caspase-1 und AIM2 in läsionaler psoriatischer Haut hervorgeht. In weiteren Experimenten, bei denen die IL-1 β -Produktion in mit poly(dA:dT) stimulierten Keratinozyten gemessen wurde, konnte außerdem zytosolische DNA als Trigger für die AIM2-Aktivierung in psoriatischen Keratinozyten *in vitro* identifiziert werden. In einer TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten entnommener Hautbiopsien von Psoriasispatienten und gesunden Kontrollen, die zum Nachweis von DNA im Zytosol angefertigt wurde, zeigten sich erhöhte Mengen an zytosolischer DNA in erkrankter Haut von Psoriasispatienten im Gegensatz zu gesunder Haut.

Da aktuelle Studien eine direkte Verbindung zwischen Inflammasomaktivierung mit erhöhter IL-1 β -Produktion und Th17-Induktion und -Aktivierung darstellen (7, 8), könnten diese Ergebnisse einen erheblichen Einfluss auf das aktuelle Verständnis der Pathogenese der Psoriasis haben (70).

4.2 Zytosolische DNA als ein entscheidendes krankheits-assoziiertes molekulares Muster in Psoriasis

Es ist bekannt, dass der IL-1 β -Signalweg zur Entstehung und dem Auftreten von T-Zell-vermittelten autoinflammatorischen Hautkrankheiten wie z. B. Psoriasis führt (10, 77). In früheren Publikationen wurde bereits gezeigt, dass in läsionaler psoriatischer Haut Keratinozyten einen Hauptursprungsort für IL-1 β darstellen, doch der dahinter verborgene Mechanismus blieb bis jetzt unklar (13, 14). Proteolytische Aktivierung von IL-1 β wird durch verschiedene Arten von Inflammasomen katalysiert und reguliert. Wir untersuchten Biopsien von betroffener und nicht betroffener Haut von Psoriatikern sowie von gesunden Kontrollen und es zeigte sich in unseren Experimenten eine erhöhte Expression von AIM2, welches ein durch zytosolische DNA getriggertes Inflammasom darstellt (64). In weiteren Experimenten, in denen primäre humane Keratinozyten mit IFN γ stimuliert und mit poly(dA:dT) inkubiert wurden und anschließend die AIM2-mRNA-Expression quantifiziert wurde, konnte außerdem ein AIM2-Anstieg sowohl durch IFN γ induziert als auch durch zytosolische DNA aktiviert werden, was in erhöhter IL-1 β -Sekretion resultierte und so gemessen werden konnte. Daraus ergibt sich, dass zytosolische DNA ein entscheidendes krankheits-assoziiertes molekulares Muster in Psoriasis darstellt, das über das AIM2-Inflammasom zur Aktivierung von IL-1 β in Keratinozyten führt. Mittels einer TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten entnommener Hautbiopsien, bei denen zytosolische DNA sichtbar gemacht werden konnte, konnte DNA nur im Zytosol in psoriatischen Läsionen nachgewiesen werden, nicht aber in gesunder Haut. Des Weiteren wurde gezeigt, dass physikalische Schädigung der Haut, wie sie in unseren Experimenten durch die „Tape-Stripping-Methode“ an der Haut gesunder freiwilliger Kontrollen hervorgerufen wurde und einen bekannten Triggerfaktor der Inflammation in Psoriasis darstellt, zytosolische DNA induziert und deswegen einen Auslöser in der Entwicklung von weiteren

Hautläsionen darstellen könnte. Außerdem wurden auch Hautproben atopischer Dermatitis, einer weiteren chronisch-entzündlichen Hautkrankheit, die durch starken Juckreiz gekennzeichnet ist, welcher häufig auch zu Hautrissen und Wunden führt, untersucht. Man kann wohl mit Recht annehmen, dass in Biopsien solch geschädigter Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis auch zytosolische DNA zu finden ist. Wir jedoch untersuchten eine Biopsie unbeschädigter Haut einer Läsion atopischer Dermatitis, was das intakte Stratum corneum beweist, und konnten keine DNA im Zytosol nachweisen. Daraus ergibt sich, dass eine Inflammation der Haut alleine - im Gegensatz zu physikalischer Verletzung - folglich nicht ausreicht, zytosolische DNA in Keratinozyten bei inflammatorischen Hautkrankheiten zu induzieren.

Während normalerweise in eukaryotischen Zellen DNA vorzugsweise im Nukleus oder in den Mitochondrien zu finden ist, wurde hier DNA im Zytosol von psoriatischen Keratinozyten nachgewiesen. Genomische DNA wird in gleicher Weise wie bakterielle oder virale DNA, die während einer Infektion mit zytosolischen Bakterien oder DNA-Viren nachgewiesen werden kann, durch das AIM2-Inflammasom erkannt und führt zu dessen Aktivierung (49).

Die Quelle für die DNA im Zytosol in psoriatischen Läsionen ist jedoch immer noch unbekannt. Möglicherweise entweicht aufgrund eines unerforschten Mechanismus in Keratinozyten psoriatischer Areale DNA aus dem Kern und gelangt so ins Zytosol. Eine weitere Vermutung ist, dass extrazelluläre freiwerdende DNA aus untergehenden Zellen der Umgebung von anderen Keratinozyten wieder aufgenommen wird (70).

4.3 LL-37 als Regulator der Autoinflammation in Psoriasis

Anhand von Keratinozyten, die mit $\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$ stimuliert und mit Cathelicidin Peptid LL-37 und poly(dA:dT) inkubiert wurden, zeigte sich, dass das Cathelicidin Peptid LL-37, das durch topische antiinflammatorische Therapie oder UVB-Phototherapie induziert werden kann, die Aktivierung des AIM2-Inflammasoms beeinflusst, indem es die zytosolische DNA in Keratinozyten neutralisiert und deren proinflammatorische, inflammasomaktivierende Wirkung außer Kraft setzt.

Cathelicidin LL-37 wurde ursprünglich als ein antimikrobielles Peptid des angeborenen Immunsystems identifiziert, das Abwehrfunktion gegen in die Haut eingedrungene

Erreger besitzt und die Entzündungskaskade aktiviert (18). In psoriatischer Haut ist LL-37 in erhöhter Konzentration zu finden, was die Untersuchung von Biopsien psoriatischer Haut und gesunder Kontrollen zeigte, und wurde deshalb als ein die Inflammation triggernder Faktor in dieser Erkrankung vermutet (24). Die oben dargestellten Ergebnisse stellen LL-37 jedoch als einen Regulator der Autoinflammation dar, der an zytosolische DNA bindet und so die AIM2-Inflammasombildung verhindert. Hieraus ergibt sich, dass AIM2 über endogene Inhibitoren wie LL-37 als Angriffspunkt für therapeutische Ansätze betrachtet werden kann, um die entzündliche Reaktion der Haut in Psoriasis herunter zu regulieren (70).

In einer früheren Publikation wurde gezeigt, dass Komplexe aus extrazellulärer DNA zusammen mit Cathelicidin Peptid LL-37 TLR9 in pDC aktivieren, was in erhöhter Interferonproduktion resultiert (45). Da Cathelicidin LL-37 mit DNA interagiert und es in der Haut psoriatischer Läsionen in erhöhter Menge exprimiert wird, vermuteten wir ursprünglich, dass LL-37-DNA-Interaktionen zu einer AIM2-abhängigen Inflammasomaktivierung führen. Stattdessen wurde jedoch von uns beobachtet, dass LL-37-DNA-Komplexe, die in das Zytosol von Keratinozyten gelangten, nicht mehr in der Lage waren, das Inflammasom zu aktivieren. So besitzt LL-37 also die Fähigkeit, ins Zytosol von Keratinozyten zu translozieren, wo es direkt an zytosolische DNA bindet und deren proinflammatorischen Effekt neutralisiert.

Die Eigenschaft von Cathelicidin LL-37, an DNA zu binden und die AIM2-Inflammasomaktivität zu blockieren, könnte möglicherweise auf die kationische Ladung des Peptids zurückgeführt werden. Andere Formen von Cathelicidin-Peptiden mit vergleichbarer elektrostatischer Ladung, aber anderer Struktur zeigten ähnliche antiinflammatorische Effekte wie LL-37. Antimikrobielle Peptide jedoch mit niedriger kationischer Ladung, wie z.B. S100-Psoriasin, das in Psoriasis ebenfalls überexprimiert wird, hatten keine Wirkung auf die Inflammasomaktivität (70, 78).

4.4 Posttranskriptionale Regulation der IL-1 β -Sekretion als Therapieansatz in Psoriasis

Dass die Th17-Reaktion in der Pathogenese der Psoriasis einen entscheidenden Faktor darstellt, ist bereits gut erforscht und bewiesen, aber auch die Rolle von IL-1 β als ein Hauptakteur in der Entwicklung der Erkrankung scheint immer mehr verstanden zu werden. Kürzlich veröffentlichte Publikationen verbinden Th17- und IL-1 β -Signalwege in der Pathogenese der Psoriasis. So ist die durch IL-23 getriggerte Entwicklung der pathogenen Th17-Zellen von der Anwesenheit des IL-1 β abhängig (6) und auch die Reifung und Zytokinproduktion der Th17-Zellen wird durch IL-1 β bewirkt und gesteigert (7, 8). Patienten, die in dem für den IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL1Ra) codierenden Gen Mutationen aufweisen, entwickeln eine inflammatorische Reaktion der Haut, die in ihrer Erscheinung der Psoriasis ähnelt und ebenso mit einer Hochregulation der IL-17-Zytokine und Infiltration von neutrophilen Granulozyten einhergeht (79, 80). Zudem zeigen Mäuse mit einer Mutation im NLRP3-Gen, die zu einer Überaktivierung des Inflammasoms mit überschießender IL-1 β -Produktion führt, spontan einen Psoriasis-ähnlichen Phänotyp der Haut mit einer von Th17-dominierten Inflammation und histologischen Kennzeichen, die für die menschliche Erkrankung typisch sind (9).

Die Beobachtung, dass ein Defekt in der Prozessierung von IL-1 β ausreicht, um eine Inflammation der Haut hervorzurufen, unterstreicht die Wichtigkeit einer posttranskriptionalen Kontrolle dieses Zytokins. Im Gegensatz zur transkriptionalen Kontrolle, erfordert die posttranskriptionale Regulation von IL-1 β , die durch die Inflammasomkomplexformierung durchgeführt wird, spezifische Gefahr-assoziierte-Muster, die zur Inflammasomaktivierung führen. So ist es von großer Bedeutung, solche molekularen Muster in inflammatorischen Krankheiten zu identifizieren, da dieser Ansatzpunkt direkt eine Möglichkeit für neue Therapien in der Behandlung entzündlicher Hautkrankheiten darstellen könnte (70).

4.5 Cathelicidin als Angriffspunkt für neue Therapien in der Behandlung der Psoriasis

Die dargestellten Daten zeigen, dass das Cathelicidin Peptid LL-37 als ein physiologischer Inhibitor des AIM2-Inflammasoms wirkt. In unbehandelter Haut von Psoriasispatienten ist LL-37 hochreguliert, doch das AIM2-Inflammasom ist - wie an der Inflammation der Haut sichtbar - immer noch aktiv. Dies führt zu der Annahme, dass die normalen Konzentrationen von LL-37 in der Haut unbehandelter Psoriasispatienten nicht ausreichen, die AIM2-vermittelte Inflammasomaktivität zu inhibieren. Durch klinische Beobachtung kann diese Hypothese auch bestätigt werden: Da Vitamin D bekanntlich eine verstärkte Expression der Cathelicidin-LL-37-Expression hervorruft, zeigen Psoriasispatienten, die mit UVB-Bestrahlung, die zu einer Erhöhung der Vitamin-D-Synthese in der Haut führt, oder durch topische Anwendung von Vitamin D behandelt werden, eine deutliche Verbesserung der inflammatorischen Reaktion der Haut (74, 81). Da Cathelicidin LL-37 viele verschiedene Wirkungen, wie Chemotaxis, Angiogenese, Stimulation von Immunzellen und Zytokinsekretion im Immunsystem hervorruft, müssen jedoch auch mögliche Nebenwirkungen eines unkontrollierten Cathelicidinanstieges und -ausschüttung bedacht werden (18). Dennoch, weil Vitamin D bis jetzt der einzige bekannte Faktor ist, der Cathelicidin in humaner Haut hochregulieren kann (18) und unsere gezeigten Ergebnisse die Relevanz von Cathelicidin LL-37 als antiinflammatorischen Mediator in der Pathogenese der Psoriasis beweisen, sollte die Entwicklung von Medikamenten, die speziell auf Cathelicidin LL-37 abzielen, Gegenstand weiterer Forschungen darstellen (70).

5. Zusammenfassung

Psoriasis ist eine chronisch-inflammatorische, nicht-infektiöse Erkrankung, die hauptsächlich an der Haut auftritt. Circa 2% der Bevölkerung weltweit sind von dieser Erkrankung betroffen, doch die Pathogenese ist bis jetzt noch nicht ganz verstanden. Es ist bekannt, dass genetische und immunologische Faktoren an ihrer Entstehung beteiligt sind (1-3).

IL-1 β und IL-17 spielen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Erkrankung. IL-1 β aktiviert die Reifung der Th17- und Th1-Helferzellen, welche wiederum die Keratinozyten aktivieren, antimikrobielle Peptide, wie z.B. Cathelicidin LL-37, TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-22, IL-17 und Chemokine zu produzieren. Bei Psoriasis sind erhöhte Level dieser oben genannten Entzündungsmediatoren zu finden (5).

Das antimikrobielle Peptid LL-37 ist ein kleines kationisch geladenes Peptid, das von Neutrophilen und Keratinozyten produziert wird. In an Psoriasis erkrankter Haut, Wunden und Hautinfektionen ist es in erhöhter Konzentration zu finden.

Antimikrobielle Peptide fungieren als endogene Antibiotika und stellen eine chemische Barriere an epithelialen Oberflächen dar. Außerdem besitzen sie eine sogenannte „Alarminfunktion“, da sie die Chemokin- und Zytokinsekretion aktivieren und die Zellmigration und Angiogenese induzieren können. Zusammenfassend könnte man sagen, dass antimikrobielle Peptide eine proinflammatorische Aktivität besitzen (18).

Inflammasome sind Caspase-1-aktivierende Multiproteinkomplexe, die sich im Zytosol von Zellen als Antwort auf Verletzung oder Infektion formieren.

Aktivierte Caspase-1 kann nun wiederum die Mitglieder der IL-1-Zytokinfamilie aktivieren. Vier so genannte Inflammasome sind bis jetzt bekannt: NLRP1, NALP3, NLRC4 (IPAF) und das AIM2-Inflammasom, welches in vorliegender Arbeit von großer Bedeutung ist (46, 50).

Im Allgemeinen erfordert die Aktivierung und Ausschüttung von IL-1 β zwei unterschiedliche Signalwege: Das erste Signal wird durch verschiedene sog. PAMPs (pathogen associated molecular patterns), wie zum Beispiel LPS, Flagellin oder andere Bestandteile der Bakterienmembran induziert, welche zu einer Toll-like-Rezeptoraktivierung führen, die wiederum die Synthese von pro-IL-1 β induziert.

Das zweite Signal, welches für AIM2 doppelsträngige DNA darstellt, resultiert in der Aktivierung des Inflammasoms, indem Caspase-1-Aktivierung zur Prozessierung von IL-1 β führt (49, 65).

Die Ziele der vorliegenden Dissertation waren, die Rolle des AIM2-Inflammasoms in Psoriasis zu untersuchen und die das Inflammasom triggernden Faktoren zu identifizieren. Darüber hinaus wurde die Bedeutung des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin LL-37 für die Erkrankung und seine Funktion in der Inflammasomaktivierung untersucht.

Es konnte nun gezeigt werden, dass pro-IL-1 β , AIM2 und Caspase-1 in psoriatischen Läsionen im Gegensatz zu gesunder Haut hochreguliert sind und das AIM2-Inflammasom aktiviert ist. Des Weiteren ist Cathelicidin LL-37 in läsionaler psoriatischer Haut verglichen mit gesunden Kontrollen überexprimiert. Außerdem ließ sich zytosolische DNA in großen Mengen und eine erhöhte AIM2-Expression in Keratinozyten psoriatischer Läsionen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen. In kultivierten Keratinozyten stellte sich heraus, dass IFN γ eine Induktion von AIM2 bewirkte. Außerdem zeigte sich, dass zytosolische DNA, welche einen wichtigen krankheitsassoziierten Faktor für Psoriasis darstellt, die Ausschüttung von IL-1 β über das AIM2-Inflammasom induzierte.

Frühere Publikationen zeigten, dass Cathelicidin mit körpereigenen DNA-Fragmenten, die durch vermehrte Apoptose in psoriatischer Haut anfallen, einen Komplex bildet, der in der Lage ist, TLR9 in plasmazytoiden dendritischen Zellen zu aktivieren. Dies resultiert in der Ausschüttung von IFN α und IFN β , die über Induktion der myeloiden dendritischen Zellen zur Aktivierung der autoreaktiven Th1- und Th17-Zellen führt. Wie oben bereits dargestellt, folgt aus der Aktivierung der T-Zellen die Produktion von IFN γ , IL-22, IL-17 und auch Cathelicidin LL-37. Dies stellt einen sich selbst triggernden Feed-Back-Mechanismus dar, der die Entstehung der Entzündungsreaktion in Psoriasis erklären könnte (17, 19, 45).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun aber gezeigt, dass LL-37/DNA-Komplexe, welche in das Zytosol von Keratinozyten eingeschleust werden, die Fähigkeit verlieren, das AIM2-Inflammasom zu aktivieren. LL-37 bindet direkt an zytosolische DNA und neutralisiert so deren proinflammatorischen Effekt.

Die Behandlung von Psoriasispatienten mit UVB-Bestrahlung oder Vitamin-D-Analoga induziert die LL-37-Produktion in läsionaler Haut und verbessert gleichzeitig die Entzündungsreaktion der Haut, so dass die Ergebnisse dieser Untersuchung eine Entwicklung von Medikamenten, die spezifisch auf die Cathelicidin-Expression abzielen, unterstützen und bekräftigen und dies auch Gegenstand zukünftiger Forschung darstellen sollte.

6. Abkürzungsverzeichnis

µg: Mikrogramm

µl: Mikroliter

Abb.: Abbildung

AIM2: Absent in Melanoma-2

AMP: Antimikrobielle Peptide

APAAP: Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase

ASC: Apoptosis-associated-speck-like-protein

ATP: Adenosintriphosphat

Bp: Basenpaare

BSA: Bovines Serumalbumin

bzw.: Beziehungsweise

CAMP: Cathelicidin antimicrobial peptide

CARD: N-terminale-caspase-recruiting-domain

cDNA: complementary DNA

CFP: Cyan-fluorescent-protein

CLR: C-type-lectin-receptor

CMV: Zytomegalievirus

CO₂: Kohlenstoffmonoxid

DAPI: 4', 6'-diamidino-2-phenylindole

DEPC: Diethyldicarbonat

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: Desoxyribonucleinacid

dsDNA: doublestranded DNA

EDGS: EpiLife[®] defined growth supplement

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

EGFR: Epidermal-growth-factor-receptor

ELISA: Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay

f./ ff.: folgend(e)/ und folgende

FACS: Fluorescence activated cell sorting

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FPRL1: Formyle-peptide-receptor-like-1

g: Erdbeschleunigung (9.81 m/s²)
gDNA: Genomische DNA
h: Stunde
H₂O₂: Wasserstoffperoxid
H₂SO₄: Schwefelsäure
hBD-1, -2, -3, -4: Humanes β-Defensin -1, -2, -3, -4
hCAP18: Human cathelicidin protein 18
HLA-B27: Human leukocyte antigen-B27
HRP: Horseradish-peroxidase
IFN γ : Interferon γ
IL-1 β / -6 / -12/ -17/ -18/ -22/ -23: Interleukin-1 β / -6/ -12/ -17/ -18/ -22/ -23
IU: International Unit (Einheit)
LPS: Lipopolysaccharide
LRR: C-terminale-Leucin-rich-repeats
MDP: Muramyl dipeptide
Min: Minuten
ml: Milliliter
mm: Millimeter
mM: Millimolar
NACHT: Nucleotid-binding and oligomerisation domain
NaCl: Natriumchlorid
NF- κ B: Nuclear-factor- κ B
ng: Nanogramm
NHEK: Normale humane epidermale Keratinozyten
NK-Zellen: Natürliche Killerzellen
NLR: NOD-like-receptor
nM: Nanomolar
Nm: Newtonmeter
PAMP: Pathogen-associate-molecular-pattern
PBGD: Porphobilinogen Deaminase
PBS: Phosphate buffered saline
pDC: Plasmacytoid dendritic cell

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride
poly(dA:dT): polydeoxyadenylic acid-poldeoxythymidylic acid double-stranded homopolymer
PSV: Psoriasis vulgaris
PUVA: Psoralen plus UV-A
PVDF: Polyvinylidenfluorid
PYD: Pyrine-domain
qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay
RLR: RIG-like-helicase
ROS: Reactive oxygen species
rpm/min: Revolutions per minute
s.: siehe
SD: Standardabweichung
SDS: Sodium Dodecyl Sulfat
Sek: Sekunden
siRNA: small interfering RNA
SLE: systemischer Lupus erythematoses
TBS: Tris-buffered Saline
TBST: Tris-Buffered Saline plus Tween 20
TLR4/ -5/ -9: Toll-like-receptor 4/ -5/ -9
TNF α : Tumor-necrosis-factor- α
Tris-HCl: Tris-hydroxymethyl-amino methane
TUNEL: terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated-X-dUTP-nick-end-labeling
Tween 20: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UVB: Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 280 bis 315nm
V: Volt
VEGF: Vascular-endothelial-growth-factor
vgl.: vergleiche
z. B.: zum Beispiel
ZnCl₂: Zinkchlorid

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schlüsselzellen und Mediatoren im Übergang vom angeborenen zum erworbenen Immunsystem in der Pathogenese der Psoriasis
- Abbildung 2: Modell für die Aktivierung des AIM2-Inflammasoms
- Abbildung 3: Expression von IL-1 β -mRNA in Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu gesunden Spendern
- Abbildung 4: Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus Biopsien läSIONaler psoriatischer Haut und Haut gesunder Spender mit spezifischen Antikörpern für aktive Caspase-1-Untereinheit p20 und pro-IL-1 β
- Abbildung 5: AIM2-mRNA-Expression in Hautbiopsien von gesunden Spendern verglichen mit läSIONaler Haut von Patienten mit Psoriasis
- Abbildung 6: AIM2-mRNA-Expression in Biopsien aus läSIONaler und nicht-läSIONaler Haut von Psoriasispatienten
- Abbildung 7: Bestimmung der AIM2-Proteinmenge durch immunhistochemische Färbungen in histologischen Schnitten von Biopsien gesunder Spender und läSIONaler psoriatischer Haut
- Abbildung 8: Quantifizierung der AIM2-mRNA-Expression in mit IFN γ , TNF α und IL-17A stimulierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 9: Effekt der Induktion der Zelldifferenzierung durch Calcium auf die AIM2-mRNA-Expression in mit IFN γ stimulierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 10: Korrelation von IFN γ - und AIM2-mRNA-Mengen in läSIONaler psoriatischer Haut
- Abbildung 11: Bestimmung der IL-1 β -Sekretion in mit TNF α /IFN γ stimulierten und anschließend mit poly(dA:dT) transfizierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 12: Effekt der DNase-Behandlung vor der Transfektion mit poly(dA:dT) auf die IL-1 β -Sekretion in mit TNF α /IFN γ stimulierten und anschließend mit poly(dA:dT) transfizierten primären humanen Keratinozyten

- Abbildung 13: Effekte von DNAs unterschiedlicher Länge auf die IL-1 β -Sekretion in mit TNF α /IFN γ stimulierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 14: Western-Blot-Analysen von aktiver Caspase-1 (Untereinheit p20) in Lysaten und Überständen von mit TNF α /IFN γ stimulierten und anschließend mit poly(dA:dT) transfizierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 15: Effekte der Transfektion von AIM2-spezifischer oder Kontroll-siRNA auf die AIM2-mRNA-Expression in primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 16: Effekte der Transfektion von AIM2-spezifischer siRNA auf die IL-1 β -Ausschüttung in mit TNF α /IFN γ stimulierten und mit poly(dA:dT) transfizierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 17: Bestimmung der pro-IL-1 β -mRNA-Expression in mit IFN γ (1-100ng/ml), TNF α und IL-17A stimulierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 18: Nachweis von zytosolischen DNA-Fragmenten durch eine TUNEL-Färbung in psoriatischen Läsionen und Haut gesunder Kontrollen
- Abbildung 19: Nachweis von zytosolischen DNA-Fragmenten durch eine TUNEL-Färbung in höherer Vergrößerung
- Abbildung 20: TUNEL-Färbung von läSIONaler Haut eines Patienten mit atopischer Dermatitis
- Abbildung 21: TissueFAXS-Quantifizierung der Färbungsintensität der TUNEL-Färbung von histologischen Schnitten psoriatischer Läsionen und gesunden Kontrollen
- Abbildung 22: Effekte einer oberflächlichen Hautverletzung auf das Auftreten von DNA im Zytosol, nachgewiesen durch eine TUNEL-Färbung
- Abbildung 23: Cathelicidin-mRNA-Expression in läSIONaler Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris und in Haut gesunder Kontrollen
- Abbildung 24: Nachweis von Cathelicidin LL-37 anhand einer Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus Biopsien läSIONaler psoriatischer Haut und gesunden Kontrollen

- Abbildung 25: Nachweis von biotinylierter DNA und LL-37 in zytosolischen Fraktionen von primären humanen Keratinozyten mithilfe eines Immunodot-Blots
- Abbildung 26: Bestimmung der IL-1 β -Sekretion in mit TNF α /IFN γ stimulierten und anschließend mit poly(dA:dT) und LL-37 (10 μ g/ml) inkubierten Keratinozyten
- Abbildung 27: Vergleich des Effektes der LL-37-vermittelten DNA-Aufnahme und der liposomalen Transfektion der DNA durch Bestimmung der IL-1 β -Sekretion in zuvor mit TNF α /IFN γ stimulierten Keratinozyten
- Abbildung 28: Quantifizierung der DNA Aufnahme mit/ohne liposomale Transfektion von FITC-markierter DNA in An- und Abwesenheit von LL-37 durch eine Flow-Zytometrie
- Abbildung 29: Visualisierung der Formation von Inflammasomkomplexen als Reaktion auf zytosolische DNA anhand einer konfokal-mikroskopischen Darstellung von CFP-ASC-exprimierenden Makrophagen
- Abbildung 30: Vergleich der Effekte von LL-37 und seinem D-Enantiomer (dLL-37) auf die IL-1 β -Sekretion in mit TNF α /IFN γ stimulierten und mit DNA transfizierten Keratinozyten
- Abbildung 31: Effekte unterschiedlicher antimikrobieller Peptide und Cathelicidinpeptidformen auf die IL-1 β -Sekretion in mit poly(dA:dT) transfizierten primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 32: Effekt der Transfektion von DNAs unterschiedlicher Länge auf die IL-1 β -Sekretion in primären humanen Keratinozyten
- Abbildung 33: Darstellung der Reaktion von FITC-markierter DNA mit Rhodamin-markiertem LL-37 im Zytosol, unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet
- Abbildung 34: Nachweis der Interaktion von LL-37 mit zytosolischer DNA mithilfe Streptavidin-überzogener magnetischer Beads, die biotinylierte DNA in zytosolischen Fraktionen aus Keratinozyten erfassen
- Abbildung 35: Nachweis der Aufnahme des mit Rhodamin-markierten LL-37 in unbehandelten, mit Kontroll-siRNA oder einer 1:1-Mischung aus zwei für die P2X7-Isoformen A-J spezifischen siRNAs behandelten NHEK

Abbildung 36: Eine schematische Zusammenfassung zeigt LL-37 als Inhibitor des AIM2-Inflammasoms in Keratinozyten

Tabelle 1: Sequenzen der zur qRT-PCR verwendeten Primer

8. Literaturverzeichnis

1. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT, Chimenti S, Costanzo A. Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Jan;120(1):1-11.
2. Moll I, editor. *Duale Reihe Dermatologie*. 6. Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2005.
3. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol*. 2011 Jan 25.
4. Hengge U, Ruzicka T, editors. *Roter Faden Dermatologie und Venerologie: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*; 2006.
5. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):496-509.
6. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010 Oct 21;467(7318):967-71.
7. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009 Aug 21;31(2):331-41.
8. Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K, et al. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13463-8.
9. Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity*. 2009 Jun 19;30(6):860-74.
10. Shepherd J, Little MC, Nicklin MJ. Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. *J Invest Dermatol*. 2004 Mar;122(3):665-9.
11. Nakajima A, Matsuki T, Komine M, Asahina A, Horai R, Nakae S, et al. TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in Il1rn^{-/-} mice. *J Immunol*. 2010 Aug 1;185(3):1887-93.
12. Mee JB, Johnson CM, Morar N, Burslem F, Groves RW. The psoriatic transcriptome closely resembles that induced by interleukin-1 in cultured keratinocytes: dominance of innate immune responses in psoriasis. *Am J Pathol*. 2007 Jul;171(1):32-42.
13. Johansen C, Moeller K, Kragballe K, Iversen L. The activity of caspase-1 is increased in lesional psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*. 2007 Dec;127(12):2857-64.
14. Renne J, Schafer V, Werfel T, Wittmann M. Interleukin-1 from epithelial cells fosters T cell-dependent skin inflammation. *Br J Dermatol*. 2010 Jun;162(6):1198-205.
15. Viguier M, Guigue P, Pages C, Smahi A, Bachelez H. Successful treatment of generalized pustular psoriasis with the interleukin-1-receptor antagonist Anakinra: lack of correlation with IL1RN mutations. *Ann Intern Med*. 2010 Jul 6;153(1):66-7.

16. Sorensen OE, Borregaard N, Cole AM. Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib Microbiol.* 2008;15:61-77.
17. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 2010 Apr;135(1):1-11.
18. Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Sep;124(3 Suppl 2):R13-8.
19. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009 Mar;30(3):131-41.
20. Kocuzilla AR, Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs.* 2003;63(4):389-406.
21. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1829-33.
22. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1664-71.
23. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 2000;1(3):141-50.
24. Yamasaki K, Gallo RL. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol.* 2008 Jan-Feb;18(1):11-21.
25. 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 Oct;20(12):2068-80.
26. Cole AM, Shi J, Ceccarelli A, Kim YH, Park A, Ganz T. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. *Blood.* 2001 Jan 1;97(1):297-304.
27. Sorensen 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 Oct 1;90(7):2796-803.
28. Zasloff M. Antimicrobial peptides and suppression of apoptosis in human skin. *J Invest Dermatol.* 2009 Apr;129(4):824-6.
29. Tossi A, Scocchi M, Skerlavaj B, Gennaro R. Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett.* 1994 Feb 14;339(1-2):108-12.
30. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, et al. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha

- by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3329-38.
31. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1995 Apr;63(4):1291-7.
 32. De Y, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1069-74.
 33. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(11):1665-72.
 34. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, et al. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4662-8.
 35. 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 Apr 1;174(7):4271-8.
 36. Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sorensen OE, Borregaard N, et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6690-6.
 37. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol.* 2004 Apr 15;172(8):4987-94.
 38. Di Nardo A, Braff MH, Taylor KR, Na C, Granstein RD, McInturff JE, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol.* 2007 Feb 1;178(3):1829-34.
 39. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S, et al. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci.* 2005 Nov;40(2):123-32.
 40. Aerts AM, Francois IE, Cammue BP, Thevissen K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jul;65(13):2069-79.
 41. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME, Hernandez-Pando R, et al. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4505-11.
 42. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy

- number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):439-48.
43. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007 Jul;23(4):370-8.
 44. Wehkamp J, Wang G, Kubler I, Nuding S, Gregorieff A, Schnabel A, et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):3109-18.
 45. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):564-9.
 46. Stutz A, Golenbock DT, Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3502-11.
 47. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):241-7.
 48. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe.* 2008 Jun 12;3(6):352-63.
 49. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):395-402.
 50. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):821-32.
 51. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):371-82.
 52. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):285-7.
 53. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):56-65.
 54. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):417-26.
 55. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):10-22.
 56. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev.* 2009 Jan;227(1):95-105.
 57. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996 Mar 15;87(6):2095-147.

58. Mills KH, Dunne A. Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation. *Nat Med*. 2009 Dec;15(12):1363-4.
59. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):28-33.
60. Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol*. 2009 Sep;19(9):455-64.
61. Choubey D, Walter S, Geng Y, Xin H. Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. *FEBS Lett*. 2000 May 26;474(1):38-42.
62. Cresswell KS, Clarke CJ, Jackson JT, Darcy PK, Trapani JA, Johnstone RW. Biochemical and growth regulatory activities of the HIN-200 family member and putative tumor suppressor protein, AIM2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jan 14;326(2):417-24.
63. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 2008 Mar 6;452(7183):103-7.
64. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):514-8.
65. Schroder K, Muruve DA, Tschopp J. Innate immunity: cytoplasmic DNA sensing by the AIM2 inflammasome. *Curr Biol*. 2009 Mar 24;19(6):R262-5.
66. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):509-13.
67. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*. 2009 Feb 20;323(5917):1057-60.
68. Woerner SM, Kloor M, Schwitalle Y, Youmans H, Doeberitz MK, Gebert J, et al. The putative tumor suppressor AIM2 is frequently affected by different genetic alterations in microsatellite unstable colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Dec;46(12):1080-9.
69. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*. 2009 Mar;10(3):266-72.
70. Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Goss C, Anz D, et al. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med*. 2011 May 11;3(82):82ra38.
71. Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an

- endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem*. 2009 May 8;284(19):12762-71.
72. Kim EJ, Park JI, Nelkin BD. IFI16 is an essential mediator of growth inhibition, but not differentiation, induced by the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4913-20.
 73. DeYoung KL, Ray ME, Su YA, Anzick SL, Johnstone RW, Trapani JA, et al. Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene*. 1997 Jul 24;15(4):453-7.
 74. Peric M, Koglin S, Dombrowski Y, Gross K, Bradac E, Buchau A, et al. Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis. *PLoS One*. 2009;4(7):e6340.
 75. Sandgren S, Wittrup A, Cheng F, Jonsson M, Eklund E, Busch S, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17951-6.
 76. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):857-65.
 77. Schon M, Behmenburg C, Denzer D, Schon MP. Pathogenic function of IL-1 beta in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice. *Clin Exp Immunol*. 2001 Mar;123(3):505-10.
 78. Schaubert J, Dombrowski Y, Besch R. Pathogenic DNA: cytosolic DNA promotes inflammation in psoriasis. *Cell Cycle*. 2011 Sep 15;10(18):3038-9.
 79. Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ, Dancey P, Frenkel J, van Royen-Kerkhoff A, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*. 2009 Jun 4;360(23):2426-37.
 80. Reddy S, Jia S, Geoffrey R, Lorier R, Suchi M, Broeckel U, et al. An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N Engl J Med*. 2009 Jun 4;360(23):2438-44.
 81. Vahavihu K, Ala-Houhala M, Peric M, Karisola P, Kautiainen H, Hasan T, et al. Narrowband ultraviolet B treatment improves vitamin D balance and alters antimicrobial peptide expression in skin lesions of psoriasis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2010 Aug;163(2):321-8.

Veröffentlichung der Arbeit

Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Goss C, Anz D, et al. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med.* 2011 May 11;3(82):82ra38.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka) in Kooperation der Arbeitsgruppen von PD Dr. med. J. Schaubert und PD Dr. rer. hum. biol. R. Besch durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zu einem erfolgreichen Abschluss gekommen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka als Direktor der Klinik für die freundliche Aufnahme an der Klinik für Dermatologie und Allergologie, wodurch mir der Zugang zu experimenteller Forschung und zu anspruchsvollem wissenschaftlichen Arbeiten ermöglicht wurde.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. J. Schaubert für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Durch seine außergewöhnliche fachliche und menschliche Kompetenz und unglaubliche Zuverlässigkeit unterstützte er mich auch in schwierigen Situationen des wissenschaftlichen und experimentellen Arbeitens mit unermüdlichem Einsatz und Engagement. Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie die fortwährende Unterstützung, die über die Grenzen dieser Arbeit hinausgehen, danke ich ihm von ganzem Herzen.

Ebenso ganz besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Y. Dombrowski für die uneingeschränkte, freundschaftliche Hilfestellung in technischen und fachlichen Fragen sowie die Betreuung und Korrektur der gesamten Arbeit bedanken. Ihr verdanke ich das Verständnis für die wesentlichen Grundlagen des wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens sowie die Vollendung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. rer. hum. biol. R. Besch bedanken, der mir sowohl den Zugang und die Unterstützung durch das Graduiertenkolleg vermittelt als auch mit zahlreichen Ideen für neue Methoden und unkonventionelle Denkansätzen einen Großteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau S. Koglin und Dr. rer. nat. M. Peric gilt mein besonderer Dank für die kompetente Hilfestellung bei verschiedensten technischen Fragestellungen, dem großen Mitwirken an dieser Arbeit und dem liebevollen Arbeitsklima während meiner Zeit im Labor. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau C. Kammerbauer für ihre technische Unterstützung und Hilfe bedanken.

Außerdem möchte ich mich noch bei Dr. med. D. Anz von der Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU München, Dr. rer. nat. M. Simanski, Prof. Dr. med. R. Gläser und Prof. Dr. J. Harder von der Universitäts-Hautklinik Kiel, Prof. Dr. med. V. Hornung vom Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie der Universität Bonn und R. L. Gallo, M. D., Ph. D. vom Department of Dermatology, University of California für das Mitwirken an dieser Arbeit bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei dem DFG-Graduiertenkolleg 1202, das sowohl durch finanzielle als auch wissenschaftliche Förderung die Durchführung dieser Arbeit unterstützt hat und mir so den Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten gebahnt hat.