

Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Bernhard Homey

Auswirkungen der Janus-Kinase-Inhibition auf anti-
mikrobielle und antivirale Abwehrmechanismen so-
wie die Immunzellausreifung

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Alina Janine Domdey
(2021)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Stephan Meller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Wagenmann

-für Nicolai Frederik Valentin Hoffmann-

Teile dieser Arbeit sind angenommen zur Veröffentlichung (April 2021):

HC. Hawerkamp, A. Domdey, L. Radau, P. Sewerin, P. Oláh, B. Homey, S. Meller.
Tofacitinib downregulates antiviral immune defence in keratinocytes and reduces T cell
Activation. *Arthritis Research & Therapy*, *in press* (2021)

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
APC	Antigen-präsentierende Zelle, <i>antigen presenting cell</i>
Avidin-HRP	Avidin- <i>Horseradish</i> Peroxidase
BCR	<i>B cell receptor</i>
°C	Grad Celsius (0 °C = 273,15 Kelvin)
CAMP	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i> , alternativ LL37
CPT	<i>Cell Preparation Tube</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
cDNA	Komplementäre DNA
CFP10	<i>10 kDa culture filtrate protein</i> , sezerniert von <i>M.tuberculosis</i>
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESAT6	<i>6 kDa early secreted antigenic target</i> , sezerniert von <i>M.tuberculosis</i>
FBS/FCS	Fötales Kälberserum, <i>Fetal bovine serum/ Fetal calf serum</i>
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
H	Stunde
HBD2	Humanes β - <i>Defensin 2</i>
HBSS	<i>Hanks`Balanced Salt Solution</i>
HCL	Salzsäure

HFLS	Humane Fibroblast-ähnliche Synoviozyten, <i>Human Fibroblast-like-synoviocytes</i>
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
IGRA	<i>IFN-γ Release Assay</i>
IL	Interleukin
ISG15	Interferon stimuliertes Gen 15, <i>Interferon stimulated gene 15</i>
JAK	Janus-Tyrosinkinase
LAM-Mtb	Lipoarabinomannan von <i>M.tuberculosis</i>
LAT	Lymphozytenaktivierungstest
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphotoxin
LTA	Lipoteichonsäure
MHC II	MHC-Klasse-II-Komplex, <i>Major histocompatibility complex II</i> ,
Min	Minuten
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OAS2	Oligoadenylat-Synthetase2
OASL	Oligoadenylat-Synthetase-ähnliches Protein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>Phosphate buffered saline</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, <i>Peripheral Blood Mono-nuclear Cell</i>
PFA	Paraformaldehyd
PsA	Psoriasis Arthritis
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RA	Rheumatoide Arthritis
Rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SB	<i>Stratum basale</i>
SC	<i>Stratum corneum</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sec	Sekunden
SFM	Serum-freies Medium
SG	<i>Stratum granulosum</i>
SS	<i>Stratum spinosum</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, <i>T cell receptor</i>
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β , <i>Transforming growth factor-β</i>
TH-Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
T _{max}	Maximale Plasmakonzentration
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
T _{1/2}	Terminale Halbwertszeit
Varizella vaccine	Varizellen Impfstoff
VZV	Varizella-Zoster-Virus
VZV gE	Oberflächenprotein des Varizella-Virus, <i>Envelope glycoprotein E</i>
VZV IE63	Latenzprotein des Varizella-Virus, <i>Immediate-Early 63 Protein</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Zusammenfassung	VII
Summary	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 T-Zellen.....	1
1.1.2 TH17-Zellen.....	4
1.1.3 Antimikrobielle und antivirale Peptide	6
1.2 Anatomie der Haut	10
1.2.1 Keratinozyten.....	12
1.3 Anatomie eines Gelenks.....	14
1.3.1 Synoviozyten.....	14
1.4 Entzündliche Erkrankungen der Haut und Gelenke.....	16
1.4.1 Psoriasis.....	16
1.4.2 Psoriasis-Arthritis.....	17
1.4.3 Rheumatoide Arthritis.....	17
1.5 Medikament Tofacitinib.....	19
1.5.1 Tofacitinib Nebenwirkungen	20
1.6 Ziele der Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Ethikvotum	24
2.2 PBMC Isolation	24
2.3 Zellkultur	26
2.3.1 Keratinozyten.....	26
2.3.2 Synoviozyten.....	29
2.3.3 T-Zellen.....	30
2.3.4 Stimulation mit Zellkulturüberständen	33
2.4 Zellvitalitätsassays	35
2.4.1 MTT-Assay für Keratinozyten.....	35
2.4.2 CellTiter-Glo® für T- Zellen und Synoviozyten	36
2.5 RNA-Isolation.....	39
2.6 cDNA- Synthese	40
2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	43
2.7.1 TaqMan™	43
2.7.2 SYBR Green	46
2.7.3 Primerpaare	47
2.8 Lymphozyten-Aktivierungstest.....	48
2.8.1 Interferon Gamma Release Assay.....	50
2.9 Auswertung und Statistik	52
2.9.1 GraphPadPrism	52
2.9.2 Zellvitalitätsassay	52

2.9.3	qPCR	52
2.9.4	Statistische Auswertung	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Zellvitalitätsassays	53
3.2	Expressionanalysen antimikrobieller Peptide	55
3.2.1	Expressionanalysen antimikrobieller Peptide in Keratinozyten	55
3.2.2	Expressionanalysen antimikrobieller Peptide in Synoviozyten	59
3.3	Expressionanalysen antiviraler Peptide	63
3.3.1	Expressionanalysen antiviraler Peptide in Keratinozyten	63
3.3.2	Expressionanalysen antiviraler Peptide in Synoviozyten	66
3.4	Einfluss des Tofacitinibs auf die T-Zell-Differenzierung, Aktivierung und Interaktion mit strukturellen Zellen	69
3.4.1	T-Zell-Differenzierung unter Tofacitinib	69
3.4.2	Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen unter Tofacitinib	71
3.4.3	Einfluss des Tofacitinibs auf die Interaktion von T-Zellen mit strukturellen Zellen	73
4	Diskussion.....	78
4.1	Die Hemmung des JAK/STAT Signalwegs beeinflusst die Sezernierung von AVPs durch Keratinozyten und HFLS.....	78
4.2	Der Einfluss der JAK-Inhibition auf die T-Zelldifferenzierung.....	82
4.3	Einfluss der JAK-Inhibition auf die T-Zellaktivierung.....	86
4.4	Schlussfolgerungen	87
5	Literatur-und Quellenverzeichnis.....	88
5.1	Tabellenverzeichnis	94
5.2	Abbildungsverzeichnis	94
6	Anhang	96

Zusammenfassung

Die Haut als das flächenmäßig größte Organ des Menschen besitzt einige Funktionen, die den Organismus vor Pathogenen schützt. An erster Stelle stehen hier wahrscheinlich die antimikrobiellen und antiviralen Peptide, die durch Keratinozyten der Epidermis sezerniert werden. Diverse Zytokine sogenannter TH17-Zellen sind in der Lage, diese Freisetzung an Peptiden zu stimulieren. Hierfür nutzen sie den Typ II-Zytokinrezeptor, dessen Bindung in einer Aktivierung des Janus Kinase (JAK) Signalwegs resultiert und schließlich die STAT-Transkriptionsfaktoren induziert.

Dies lässt vermuten, dass eine Hemmung des JAK/STAT Signalwegs eine Reduktion der Produktion antimikrobieller und antiviraler Peptide zur Folge haben könnte. Eine solche verminderte Sekretion durch Keratinozyten könnte dementsprechend in einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle und virale Infektionen resultieren.

Außerdem könnte eine Inhibierung des JAK/STAT Signalwegs zudem einen Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung haben. Das bedeutet, die Blockade dieses Signalwegs könnte die Differenzierung dahingehend beeinflussen, dass anstelle einer pathogenen autoimmun wirksamen TH17-Zelle eine nicht-pathogene TH17-Zelle entsteht. Eine solche Änderung würde erklären, weshalb diverse Autoimmunerkrankungen unter JAK Inhibition deutliche Verbesserungen des Krankheitsbildes zeigen.

Um diese Hypothesen zu prüfen, wurden Keratinozyten, Synoviozyten und T-Zellen stimuliert sowie mit dem JAK Inhibitor Tofacitinib inkubiert. Im Anschluss wurde mittels qPCR der Einfluss auf die Genexpression der entsprechenden Zellen analysiert. Zusätzlich wurden Lymphozyten-Aktivierungstests und *Interferon-gamma release assays* durchgeführt, um den Einfluss der Zugabe von Tofacitinib auf die Aktivierung peripherer Blutzellen zu testen.

Summary

The skin as the biggest human organ has a lot of functions to protect the organism against pathogens. The first line of the host's immune defense are antimicrobial and antiviral peptides which are secreted by epithelial cells (keratinocytes). Cytokines derived from TH17 cells are able to induce this secretion of peptides. Therefore, they transduce their signal via the type II cytokine receptor, and the signal transduction of this receptor in turn involves Janus kinases (JAK) which induce signal transducers and activators of transcription (STATs).

This implies that an inhibition of the JAK/STAT pathway could lead to a reduced secretion of antimicrobial and antiviral peptides by keratinocytes. Such a reduction could thereby support an enhanced susceptibility to different kinds of bacterial and viral infections.

In addition a blockage of the JAK/STAT pathway might also influence the T cell differentiation. To be exact, that means that a blockage of this pathway could drive the differentiation of TH17 cells towards a more regulated instead of a pathogenic phenotype. Such an alteration may explain the improvements seen under JAK inhibition in different autoimmune diseases.

To prove these hypotheses, keratinocytes, synoviocytes and T cells were stimulated with various agents as well as JAK inhibitor tofacitinib. The next step was to analyse the impact of JAK inhibition in regard to the gene expression via qPCR. Additionally, lymphocyte activation tests and interferon-gamma release assays were performed to detect the impact of tofacitinib on the activation of peripheral blood cells.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem wird grob in die angeborene und die erworbene Immunität unterteilt. Das angeborene Immunsystem ist dem Menschen von Geburt an gegeben, wohingegen die erworbene Immunität erst mit der Zeit ausgebildet wird und ausreift [1].

Ohne das Immunsystem wäre der menschliche Körper nicht nur vollkommen wehrlos gegenüber Noxen, die von extern eindringen, sondern auch nicht in der Lage, körpereigene entartete Zellen auszuschalten. Im Normalfall sollte der Körper jedoch keine eigenen Zellen angreifen, weshalb es essentiell ist, zwischen körpereigenen und fremden Zellen unterscheiden zu können. Auf der Oberfläche von Bakterien oder Viren sind spezielle Oberflächenproteine vorhanden, die als Antigene bezeichnet werden und bei Kontakt mit Rezeptoren auf einer Immunzelle eine Immunreaktion auslösen. Die Zellen, die ein solches Antigen erkennen und schließlich den T-Zellen präsentieren können, nennt man Antigen-präsentierende-Zellen (engl. *antigen-presenting cell*, (APC)). Sie nehmen das Antigen auf und präsentieren es mit Hilfe ihres MHC-Klasse-II Komplex Moleküls (engl. *Major histocompatibility complex II* (MHC II)) auf ihrer Oberfläche. Ist das Antigen bereits bekannt, verläuft eine solche Reaktion deutlich schneller als bei einem unbekanntem. Auf den körpereigenen Zellen befinden sich ebenfalls Oberflächenproteine, damit sie vom Immunsystem als körpereigen erkannt werden können. Während der Immunzellausreifung wird das Erkennen dieser Moleküle von den Immunzellen „gelernt“. Liegt hier ein Fehler vor und Immunzellen erkennen körpereigene Zellen nicht als solche, spricht man von einer autoimmunen Reaktion, die zur Ausbildung einer Autoimmunkrankheit führen kann [2, 3].

1.1.1 T-Zellen

Bei den T-Zellen handelt es sich um so genannte T-Lymphozyten, also um lymphozytäre Zellen. Zusammen mit den B-Lymphozyten, den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und den Granulozyten gehören sie zu den Leukozyten, welche auch als weiße Blutkörperchen bezeichnet werden (siehe Abb.1).

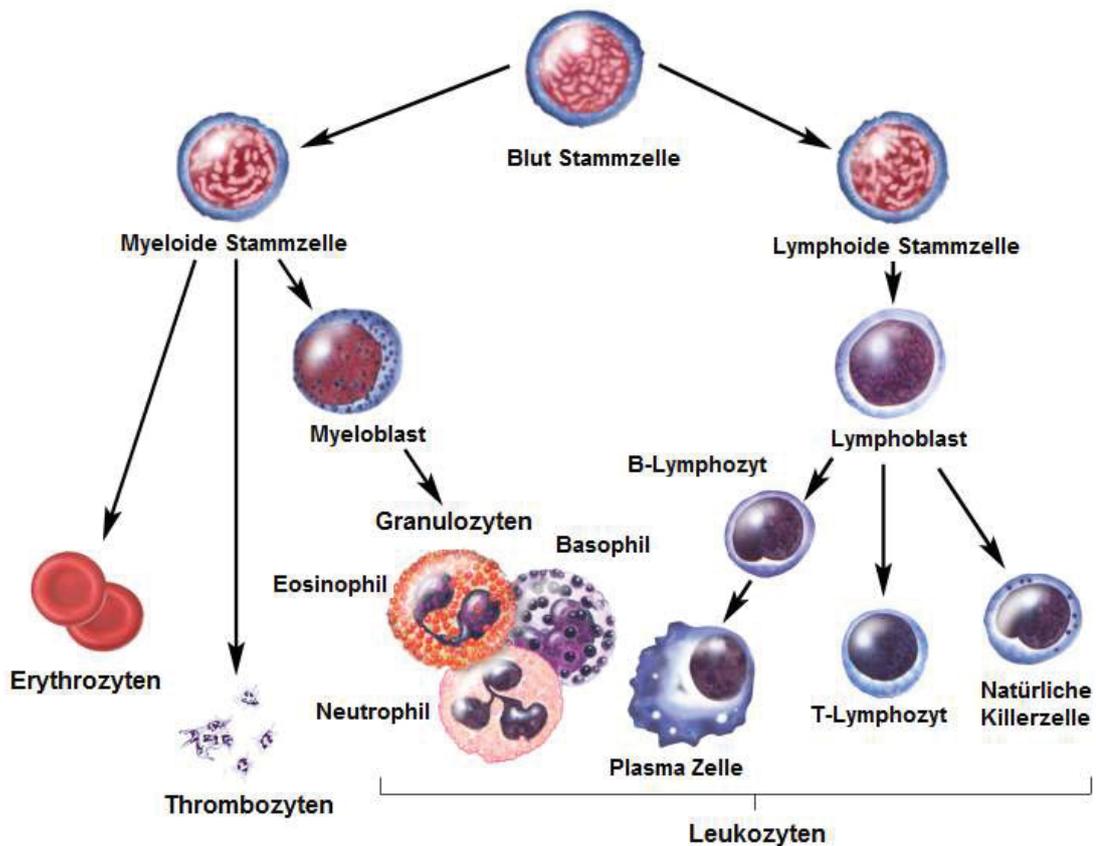


Abb. 1: Blutzellentwicklung

Die Entwicklung der Blutzellen wird in zwei Linien unterteilt: die lymphoide und die myeloide Linie. Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten gehen aus myeloiden Stammzellen hervor, während alle Lymphozyten inklusive der natürlichen Killerzellen aus lymphoiden Stammzellen hervor gehen. Verändert nach: Terese Winslow 2007 und genehmigt Winslow [4]. For the National Cancer Institute © 2007 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

Während die B-Zellausreifung im Knochenmark stattfindet, reifen die T-Zellen im Thymus heran. Hier wird darauf geachtet, dass nur Zellen, die nicht auf körpereigene Antigene reagieren, weiter entwickelt werden. Erkennt eine T- oder B-Zelle diese Antigene als fremd, wird entweder der entsprechende T-Zellrezeptor (TCR) oder B-Zellrezeptor (BCR) ausgetauscht, oder die Zelle geht in die Apoptose über [5].

Generell lassen sich T-Zellen in T-Helferzellen, die das *Cluster of Differentiation (CD) 4* auf der Oberfläche tragen, und zytotoxische T-Zellen (mit CD8 auf der Oberfläche) unterteilen. Bei den T-Helferzellen unterscheidet man nun zwischen regulatorischen T-Zellen (Treg) und Effektor-T-Zellen (TH-Zellen). Effektor-T-Zellen lassen sich wiederum anhand ihrer Transkriptionsfaktoren und sekretierten Zytokine in sogenannte TH1-, TH2 oder TH17-Zellen einteilen (Abb.2). Tregs sind dafür bekannt, dass sie autoimmune Reaktionen oder beispielsweise die Antwort auf eine Infektion inhibieren. Durch den transformierenden Wachstumsfaktor- β (engl. *Transforming growth factor- β* (TGF- β))

wird die Differenzierung der Treg-Zelle aus einer CD4+ T-Zelle induziert (Abb.2). Dies geschieht, indem TGF- β den Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein P3* (Foxp3), der zur Treg-Zelldifferenzierung essentiell ist, stimuliert [7]. Interessant ist außerdem, dass das akute-Phase-Protein IL-6 die Treg-Zelldifferenzierung inhibiert, während es zusammen mit TGF- β die Bildung von TH17-Zellen induziert. Dementsprechend ist abhängig von den Zytokinen in der Umgebung, welche Art der T-Zelldifferenzierung vollzogen wird. Im Falle einer Reaktion des Immunsystems auf ein entzündliches Geschehen wird durch die Präsenz von IL-6 eine TH17-Zelle entstehen, während in einem Umfeld ohne IL-6 Ausschüttung eine anti-inflammatorische Treg-Zelle ausdifferenziert, die eine Immunantwort unterdrückt [5, 8].

Inzwischen ist bekannt, dass eine Störung in der Ausdifferenzierung der Tregs einer der Gründe für das Auftreten von Autoimmunerkrankungen ist. Außerdem ist Funktion und Anzahl der Treg-Zellen bei Autoimmunerkrankungen gesenkt [5, 9].

Während Tregs Reaktionen des Immunsystems inhibieren, ist es die Aufgabe der TH-Zellen, intrazelluläre und extrazelluläre Pathogene zu bekämpfen. Dies gelingt, indem sie die zelluläre Seite des Immunsystems anregen und Interferon- γ (INF- γ) sowie Lymphotoxin (LT) freisetzen [10]. Es handelt sich dementsprechend um eine Art funktionelle Antagonisten.

Problematisch kann dies werden, wenn es zu einer übermäßigen Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt. Bei einer erhöhten TH1-Antwort kommt es beispielsweise zu inflammatorischen und autoimmunen Störungen bei betroffenen Patienten. Eine vermehrte Sezernierung durch TH2-Zellen ist assoziiert mit vermehrten atopischen Erkrankungen wie allergischem Asthma bronchiale oder Rhinokonjunktivitis. Im Tierversuch zeigte sich, dass auch eine verstärkte TH17-Antwort negative Auswirkungen auf den Körper hat. Vor allem TH17-Zellen mit einer Spezifizierung auf körpereigene Antigene führen zu einem vermehrten Auftreten von Autoimmunerkrankungen [11].

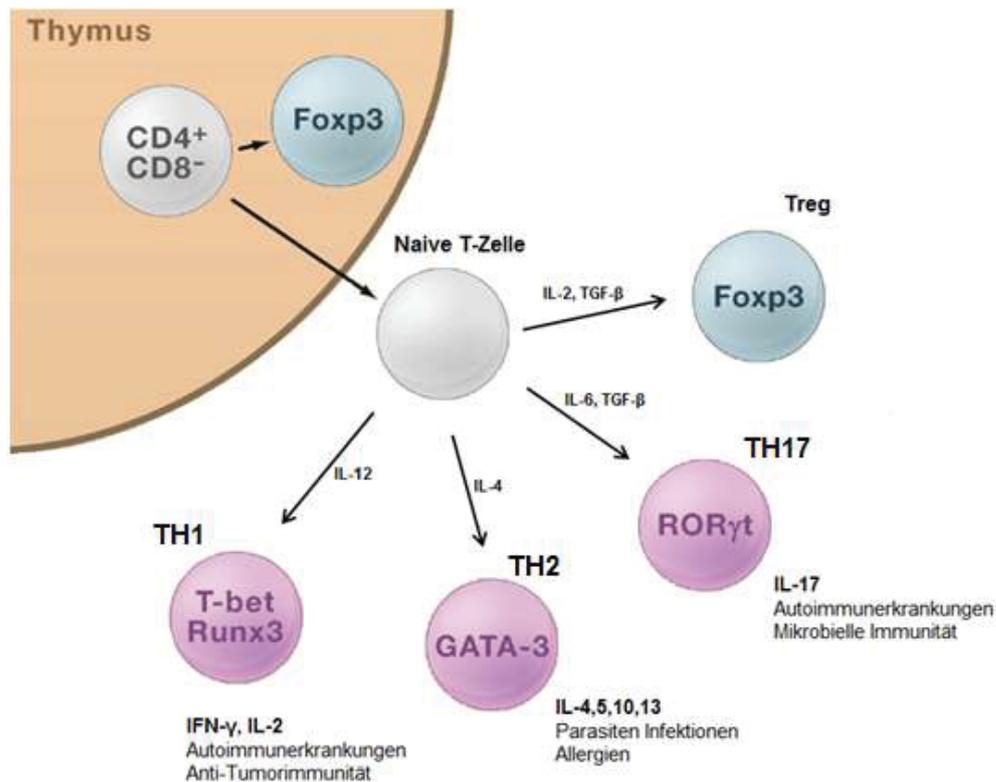


Abb. 2: Differenzierung einer CD4+ T-Zelle in effektorische oder regulatorische T-Zellen

In Gegenwart verschiedener Zytokine entstehen aus naiven T-Zellen verschiedene Subtypen von T-Zellen. Gezeigt wird, welche Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung verantwortlich sind und welche Produkte von den jeweiligen Zellen ausgeschüttet werden. Ebenfalls gezeigt wird, welche TH-Zelle mit welchem systemischen Effekt oder Beitrag zur Immunabwehr assoziiert ist. Verändert nach Sakaguchi *et al.* 2008 [5]

1.1.2 TH17-Zellen

TH17-Zellen gehören zu den drei wichtigsten Subtypen der T Helferzellen (TH-Zellen) (Abb.2) und spielen in der Abwehr gegen extrazelluläre Pathogene eine wichtige Rolle.

TH17-Zellen sezernieren hauptsächlich IL-17, was ihre Namensgebung erklärt. Früher nahm man an, dass Auslöser hierfür eine IL-23 Freisetzung ist, neuere Erkenntnisse zeigen, dass TGF-β1 in Kombination mit IL-6 sowie die Transkriptionsfaktoren STAT3 und RORγt für die TH17-Zelldifferenzierung verantwortlich sind. IL-23 dagegen wird eher als stabilisierender Faktor eingestuft. IL-21 spielt eine große Rolle in der Amplifizierung der TH17-Zelle [11, 12].

Während TH1-Zellen dafür bekannt sind, dass sie intrazelluläre Pathogene bekämpfen und TH2-Zellen für die Abwehr extrazellulärer Pathogene unerlässlich sind, geht man davon aus, dass TH17-Zellen die Lücken in der Immunabwehr zwischen den beiden TH-Zellen schließen [10, 11]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass nicht alle TH17-Zellen von Natur aus pathogen sind. Erst der Kontakt mit IL-23 hat zur Folge,

dass die Konzentration an anti-inflammatorischem IL-10 in sich differenzierenden TH17-Zellen drastisch abnimmt [13]. Dies hat eine autoimmune Wirkung und dementsprechend eine Pathogenität der TH17-Zellen zur Folge. Lee *et al.* beschreiben, dass es aufgrund der großen Plastizität von TH17-Zellen auch möglich ist unabhängig von IL-23 eine pathogene TH17-Zelle zu erhalten, wenn in der Zelldifferenzierung einer naiven T-Zelle IL-6 in Kombination mit TGF- β 3 anstelle von TGF- β 1 vorliegt [14]. Der Transkriptionsfaktor T-bet, der eine Rolle bei der Differenzierung zu TH1-Zellen spielt, wird ebenfalls mit der Entstehung pathogener IL17 produzierender TH-Zellen in Verbindung gebracht. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tiere, denen T-bet fehlte, vor dem Ausbruch einer Autoimmunerkrankung geschützt waren [15]. Es liegt nahe, dass T-bet mit der endogenen Produktion von TGF- β 3 in TH17-Zellen assoziiert sein könnte, jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht geklärt. Die Expression von T-bet in TH17-Zellen wiederum wird gefördert durch IL-23 und dieser Kreislauf wird vollendet dadurch, dass T-bet seinerseits die Genexpression des IL-23 Rezeptor (IL-23R) steigert, was den Zusammenhang des Zytokins mit pathogenen TH-Zellen erklärt. TGF- β 1 dagegen hemmt die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und des IL-23R. Zudem steht der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) anscheinend zusätzlich mit der Wirkungsweise pathogener TH-Zellen in Verbindung, der genaue Mechanismus der Aktivierung ist jedoch noch unklar [7, 14, 16, 17].

Das Interleukin IL-17 besitzt 6 verschiedene Unterarten, wobei TH17-Zellen nur IL-17A und IL-17F produzieren [18, 19]. Man geht davon aus, dass die Zytokine einzeln, aber auch zusammen als Heterodimere ihre Wirkung entfalten und eine Immunantwort auslösen können [20]. Die Zytokine wirken auf gewisse Zellen pro-inflammatorisch und lösen in ihnen die Ausschüttung von diversen Zytokinen, Chemokinen und Metalloproteinasen aus. Speziell in der Abwehr von Bakterien mit einer dünnen Peptidoglykanschicht (Gram-negativ) und Pilzen ist eine IL-17 Freisetzung sehr hilfreich. Allerdings ist IL-17 auch in Geweben nachweisbar, die von einer Autoimmunerkrankung wie der rheumatoiden Arthritis (RA) betroffen sind.

Zusätzlich werden in TH17-Zellen auch Interferon (IFN)- γ , IL-21, IL-22, IL-26 und IL-29 produziert, wobei IL-29 eine wichtige Rolle in der antiviralen Abwehr spielt [8, 11, 21-23].

Entscheidend ist, dass IL-22, IL-26, IL-29 und IFN- γ an Rezeptoren binden, die zur Typ II Zytokinrezeptor Familie gehören [24, 25]. Dies hat zur Folge, dass TH17-assoziierte Zytokine in ihren Effektorzellen, wie beispielsweise Keratinozyten (später im

Detail beschrieben), eine Signaltransduktion über den Janus Kinase (JAK) Signalweg bewirken. Zusätzlich wirken IL-6 und IL-23 ebenfalls über den JAK Signalweg, was ihm eine große Rolle in der T-Zelldifferenzierung einbringt [26, 27]

1.1.3 Antimikrobielle und antivirale Peptide

Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) kommen vor allem in den epithelialen Grenzzonen des menschlichen Körpers zur Umwelt vor. Sie reagieren, anders als die Immunzellen, nicht spezifisch auf bakterielle Reize. Sie wirken durch ihre positive (kationische) Ladung, die es ihnen ermöglicht, z.B. bakterielle Proteasen zu hemmen oder Bakterien auszuschalten, indem sie an die Membran binden und Poren verursachen. Um ein Bakterium angreifen zu können, muss das AMP zunächst mit Hilfe elektrostatischer Bindungen an der Oberfläche anhaften. Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäuren (LTA) dienen hier unter anderem als Angriffspunkt. Diese äußeren Strukturen gram- bzw. gram+ Bakterien müssen im nächsten Schritt überwunden werden, um an die Doppelmembran zu gelangen. Erst dann ist es möglich, Poren durch die Membran herzustellen [28].

Humane Immunzellen, wie beispielsweise TH17-Zellen reagieren auf bakterielle Antigene mit einer Sezernierung von IL-22, IL-17A und IL-17F. Diese Zytokine lösen in Keratinozyten eine vermehrte Produktion von humanem β -Defensin2 (HBD2), Psoriasin (S100A7), S100A8 und S100A9A9 aus (Abb.3). Psoriasin (S100A7) ist ein AMP, welches vor allem in psoriatischen Hautläsionen verstärkt vorkommt und ausschließlich von Keratinozyten produziert wird. Diese Exklusivität unterscheidet Psoriasin von den verwandten Proteinen S100A8 und A9, die zusätzlich auch von myeloiden Blutzellen hergestellt werden können [29]. Eine wichtige Aufgabe des Psoriasins ist es, die Haut vor einer Infektion durch das Darmbakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) zu schützen. Es scheint so, als habe sich S100A7 auf *E.coli* spezialisiert, was es von anderen AMPs unterscheidet, die ein breiteres Spektrum an Bakterien bekämpfen [30].

Während manche AMPs wie HBD1 dauerhaft von Keratinozyten sezerniert werden, werden andere nur dann produziert, wenn eine akute Entzündung oder Infektion vorliegt. Hierzu zählen die genannten Defensine HBD2 und 3, sowie S100A7, A8 und A9. Cathelicidine, wie LL37, welches vom CAMP-Gen codiert wird, werden ebenfalls erst bei Auftreten einer Entzündung, wie z.B. bei einer Erkrankung wie der Psoriasis, von Keratinozyten produziert [28, 31-33].

Während eine verminderte Produktion von AMPs zu Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis führt, liegt bei chronischen Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis eine vermehrte Aktivität an TH1- und TH17-Zellen und dementsprechend auch eine übermäßige Produktion an AMPs vor, was erklärt, warum bei diesen Patienten im Vergleich keine vermehrten Infektionen auftreten [32, 34].

Antivirale Peptide

Ähnlich wie die AMPs sind auch die antiviralen Peptide (AVP) ein wichtiger Teil der adaptiven Immunabwehr des menschlichen Körpers. Antivirale Effekte werden hauptsächlich durch IFN- γ und IL-29 induziert.

Kommt es zu einer viralen Infektion, so wird die IL-29 Produktion amplifiziert. IL-29 stimuliert daraufhin die Sezernierung von AVPs. Dies geschieht über die Bindung an einen Klasse II-Zytokinrezeptor der Zielzelle [35, 36]

Die Wirkungsweise von IFN- γ ist hinlänglich bekannt und ist so ausschlaggebend, dass Menschen, denen der IFN-Rezeptor fehlt, an viralen Infektionen versterben [37]. IFN- γ nutzt für die Effekte in Keratinozyten den JAK/STAT Signalweg, wobei der Interferon Rezeptor aus JAK1 und JAK2 besteht [25]. Inzwischen sind vier Signalwege bekannt, deren antivirale Effekte durch die IFN- γ induzierte JAK/STAT Induktion ausgelöst werden [38].

Einer dieser vier Signalwege ist der „ISG15 ubiquitin-like Signalweg“. Das Interferon stimulierte Gen 15 (engl. *Interferon stimulated gene 15* (ISG15)) ist ein dem Ubiquitin ähnelndes Molekül, welches von Typ-I Interferonen stimuliert wird und eng mit der Abwehr viraler Infektionen in Verbindung steht. Es konnte nachgewiesen werden, dass ISG15 in der Lage ist, diverse Viren zu inhibieren. Dazu zählen unter anderem das humane Papilloma-Virus, das humane Varizella Zoster-Virus (VZV) oder auch das Influenza-Virus [39]. Es werden also nicht nur DNA-, sondern auch RNA- und Retroviren von ISG15 beeinflusst. Diese Erkenntnisse zeigten sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Studien konnten zeigen, dass ISG15 beispielsweise das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) hemmt, indem die Freisetzung und das so genannte *Budding* der Viren aus der Wirtszelle unterbunden werden. Ein anderer Mechanismus der Hemmung kommt beim Influenza-Virus zum Einsatz. Hier wird davon ausgegangen, dass ISG15 als Antagonist der viralen Replikation wirkt [38, 40, 41].

Des Weiteren ist der „Mx GTPase Signalweg“ wichtig für die IFN-vermittelte antivirale Abwehr, denn das Interferon-induzierte GTP-bindende Protein MXA (synonym: MX1)

zeigt ebenfalls antivirale Aktivität. Es handelt sich um eine GTPase, die durch Typ I- und Typ III-Interferon induziert die Transkription und Replikation von Influenza Viren und anderen DNA- sowie RNA-Viren hemmt [38, 42, 43].

Als drittes existiert der „2,5 Oligoadenylat-Synthetase/RNaseL Signalweg“. Er umfasst die Gruppe der Oligoadenylat-Synthetasen, zu denen unter anderem die Oligoadenylat-Synthetase2 (OAS2) und das *Oligoadenylat-Synthetase-like Protein* (OASL) gehören. Sie sind in der Lage, aus Adenosintriphosphat (ATP) Oligomere des Adenosins zu synthetisieren, was zu einer Aktivierung der latenten Form der RNase L führt [44]. Die aktive Form der RNase L sorgt für einen Zerfall der viralen RNA. Die OAS-Proteine werden durch IFN- γ stimuliert und zusätzlich sorgt die Präsenz der degradierten RNA Fragmente durch die RNase L zu einer Anregung der IFN-Ausschüttung [38, 44, 45].

Als vierter und damit letzter Signalweg ist kurz der „Protein Kinase R Signalweg“ zu nennen. Die Protein Kinase R ist eine durch IFN und virale RNA aktivierte Kinase, die in der Lage ist, die eukaryotische RNA-Translation zu hemmen, um zu verhindern, dass eingeschleuste virale RNA übersetzt wird [38, 46].

Die Induktion von antiviralen als auch antimikrobiellen Peptiden durch TH17-Zellen ist in Abb.3 veranschaulicht.

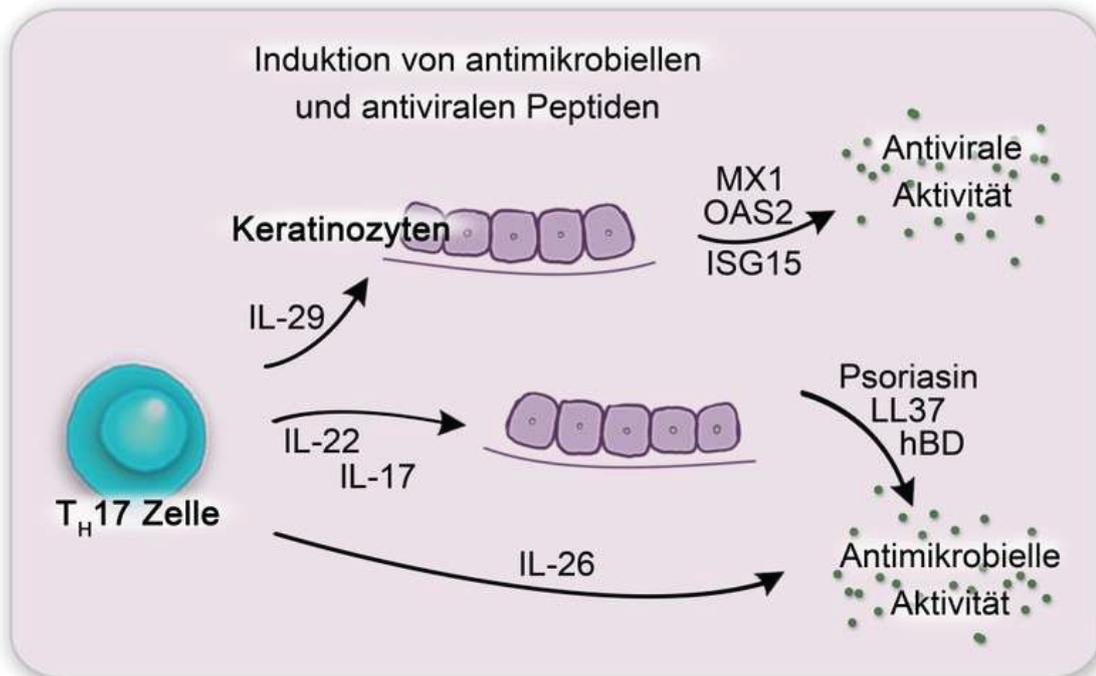


Abb. 3: Induktion antimikrobieller und antiviraler Peptide durch TH-17-Zellen

TH17-Zellen produzieren IL-22 und IL-17 welche in Keratinozyten die antimikrobielle Aktivität durch Produktion von Psoriasin, LL37 und humane Defensine aufrechterhalten. Das von TH17-Zellen sezernierte IL-26 zeigt direkte antimikrobielle Aktivität. Zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Aktivität, können TH17-Zellen auch die antivirale Abwehr durch Sekretion von IL-29 beeinflussen. Dieses Interleukin löst in Keratinozyten die Expression von antiviralen Substanzen wie MX1, OASL oder ISG15 aus. Zusätzlich zu IL-29 wirkt auch IFN- γ auf die antivirale Abwehr. Da es sich allerdings um ein Zytokin handelt, welches hauptsächlich von TH1-Zellen sezerniert wird, ist es hier nicht dargestellt. Auf diese Art und Weise wird in den Keratinozyten die Sezernierung der Peptide angeregt, wodurch es zu einer erhöhten antimikrobiellen oder antiviralen Aktivität kommt. Quelle: eigene Darstellung.

1.2 Anatomie der Haut

Die menschliche Haut ist das Organ mit der größten Oberfläche und dient dem Körper als Schutzbarriere vor der Umwelt. Sie lässt sich grob in drei Schichten unterteilen. Die oberste Hautschicht wird von der Epidermis gebildet, gefolgt von der Dermis und der Subcutis. Genauer lassen sich jedoch auch einzelne Schichten der Epidermis beschreiben, die ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel bildet [47-49].

Der oberste und damit äußerste Teil der Epidermis wird als Stratum corneum bezeichnet, da es sich hierbei um mit Keratin angereicherte, abgestorbene Zellen handelt. Diese Zellschicht bietet vor allem einen physikalischen Schutz vor der Umwelt [50]. Die Zell-Zell-Verbindungen der nachfolgenden Schichten unterstützen diese Art des Schutzes, wobei in diesen Hautschichten auch eine biochemische Abwehr vorliegt. Durch Immunzellen oder AMPs werden Pathogene erkannt und beseitigt. Das Stratum corneum besteht aus so genannten Korneozyten, die sich aus Keratinozyten entwickeln und ihre Gestalt dementsprechend verändern. Diese Zellen haben ihre mitotische Funktion komplett verloren und werden mit der Zeit durch Exfoliation abgeschilfert. Nicht nur für den mechanischen Schutz ist diese Schicht unerlässlich, ebenfalls der übermäßige transepidermale Wasserverlust wird durch diese Art Barriere verhindert. Die Desmosome des Stratum corneum werden als Korneodesmosome bezeichnet und sorgen für einen starken Verbund der einzelnen Zellen [48, 51].

An das Stratum corneum angrenzend befindet sich das Stratum granulosum (Abb. 4). Diese Schicht besteht aus flachen, granulierten, polygonalen Keratinozyten, die sich kurz vor der Verhornung befinden. Per Exozytose können sich die Zellen ihrer Granula entledigen, während der lipidhaltige Inhalt im Extrazellularraum eine gewisse Schutzfunktion übernimmt. Zu diesem Zeitpunkt besitzen die Zellen noch einen funktionsfähigen Nukleus [47, 52]. In dieser Schicht und im darunter liegenden Stratum spinosum sind die Keratinozyten stark mittels sogenannter *Tight-junctions* verbunden. Diesen undurchlässigen Zell-Zell-Kontakten konnte ebenfalls eine große Rolle bezüglich der Barrierefunktion der Haut zugeschrieben werden. Bei Beeinträchtigungen des Stratum corneum, wie es bei Patienten mit Psoriasis vulgaris vorkommt, kann man die *Tight-junctions* Proteine Claudin4 und Occludin, die normalerweise im Stratum granulosum und in oberen Anteilen des Stratum spinosum vorkommen, auch in viel tieferen Hautschichten detektieren. Dies lässt eine reaktive Produktion von *Tight-junctions* vermuten, die wahrscheinlich dazu dient den fehlenden Schutz des Stratum corneum bei Beeinträchtigung auszugleichen [48].

Zwischen Stratum granulosum und Stratum basale befindet sich die dickste Schicht der Epidermis, das Stratum spinosum (Abb.4). Während die untersten Zellschichten des Stratum spinosum ähnlich mitotisch aktiv sind wie das Stratum basale, verlieren die oberen Zellschichten des Stratum spinosum diese Fähigkeit und flachen immer weiter ab, je höher sie vordringen. Das Immunsystem betreffend liegen hauptsächlich die Langerhans-Zellen vor und übernehmen hier die Funktion antigenpräsentierender Zellen. In ihren phagozytären und immunologischen Eigenschaften ähneln sie den Makrophagen des Blutes [47].

Die unterste Schicht der Epidermis wird vom Stratum basale gebildet (Abb.4). Es handelt sich um eine einzellige Schicht aus Keratinozyten, welche über große Nuklei verfügen. Über sogenannte Hemidesmosome sind sie mit der Basalmembran verbunden, der sie aufsitzen. Hier findet die Zellteilung statt und manche der gebildeten Zellen wandern als Spinal-Zellen in das Stratum spinosum ein, um schließlich langsam an die Hautoberfläche zu gelangen. Andere Keratinozyten verbleiben in der Basalschicht als Stammzellen. Neben den Keratinozyten, die den Großteil der Zellen der Epidermis ausmachen, befinden sich in dieser obersten Hautschicht zusätzlich noch Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkel-Zellen [47, 49].

Unter der Epidermis befindet sich die Dermis. Ihre Funktion ist die Befestigung und Ernährung der Epidermis. Strukturell lässt sie sich in Stratum papillare und Stratum reticulare unterteilen. Das Stratum papillare grenzt direkt an die Basalmembran der epidermalen Schichten an, während das Stratum reticulare unklar an die Subcutis grenzt. Die Dermis beherbergt neben verschiedenen bindegewebigen Strukturen kleine Blutgefäße und Nervenfasern. Außerdem ist sie der Ursprung der Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel und Schweißdrüsen [47].

Die unterste Hautschicht wird von der Subcutis gebildet. Diese Schicht besteht aus lockerem Bindegewebe, die größere Blutgefäße und Nervenfasern umgibt. Zusätzlich ist hier das subkutane Fettgewebe lokalisiert, welches abhängig von Lokalisation und individuellen Gegebenheiten stark in seiner Ausdehnung variieren kann. Dieses Fettdepot ist wichtig für die thermische Isolation und dient als Energiespeicher [47].

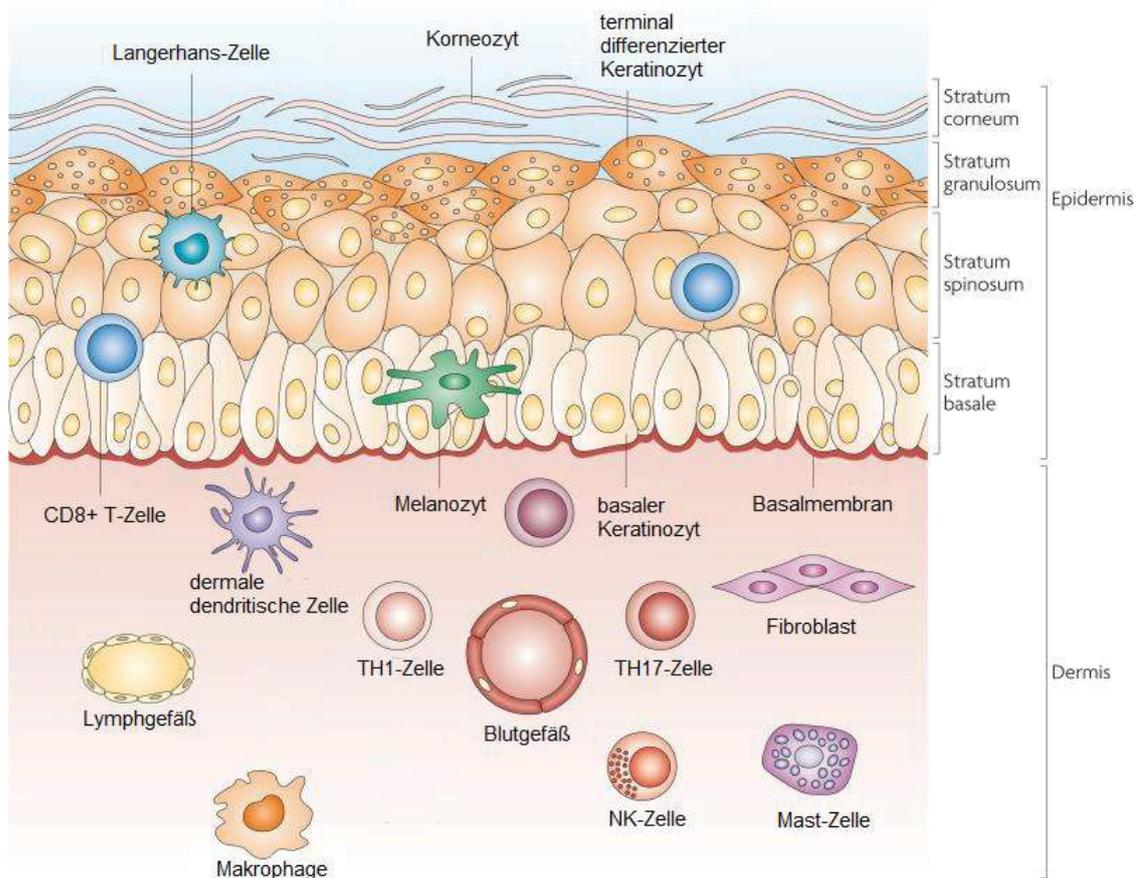


Abb. 4: Die Zellen der oberen Hautschichten

Die Abbildung zeigt die oberen beiden Hautschichten (Epidermis und Dermis). Die Schichtung der Epidermis in Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale wird ebenfalls verdeutlicht. Zusätzlich sind die strukturellen Zellen der Epidermis als auch die Immunzellen dargestellt, die in der Haut zu finden sind. Modifiziert nach Nestle *et al.* 2009 [49].

1.2.1 Keratinozyten

Keratinozyten machen mit 90 % den Hauptanteil der Zellen in der menschlichen Haut aus und spielen unter anderem eine wichtige Rolle bezüglich der Immunabwehr gegen exogene Faktoren [49]. Die gesamte Architektur der menschlichen Haut basiert auf Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten in den einzelnen Hautschichten, die im Stratum basale beginnt. Keratinfilamente verbinden die Zellen untereinander mit Hilfe der Desmosome und sorgen so für Stabilität. Der lipidhaltige Inhalt der Granula dagegen ist wichtig für die Abwehr gegen exogene Pathogene und füllt die Lücken der extrazellulären Matrix, sobald er exozytiert wurde [53]. Keratinozyten produzieren essentielle Chemokine, Zytokine und immunologisch aktive Moleküle, sowohl in gesunden, als auch in inflammatorisch aktiven Geweben [54]. Sie sind in der Lage, verschiedene CCL-Chemokine auszuschütten, was TH2-Zellen anlockt und in allergischen Reaktionen eine Rolle spielt. Eine Chemokin-Ausschüttung durch Keratinozyten von beispielsweise CXCL8 kann durch IL-17 oder IL-22 hervorgerufen werden und hat eine

Ansammlung von TH1-Zellen und neutrophilen Granulozyten zur Folge. Der Stimulus zur Chemokin-Sezernierung durch Keratinozyten erfolgt durch eingewanderte T-Zellen [55, 56].

Keratinozyten sind außerdem in der Lage zwischen kommensalen und pathogenen exogenen Faktoren zu unterscheiden [49]. Anhand von Toll-like-Rezeptoren (TLR) können sie pathogene Stimuli wie zB. LPS erkennen und eine dementsprechende Immunantwort auslösen, was in einer Sezernierung von CXCL8 und anderen Chemokinen, sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) resultiert [57]. Hiermit spielen sie eine sehr wichtige Rolle in der TH1-Zellantwort, da sie diese vermittelt durch TLR aktivieren [58].

Die Wundheilung der Haut basiert ebenfalls auf der Differenzierung und Proliferation der Keratinozyten. Hierbei kommunizieren die Zellen von Epidermis und Dermis via Zytokinen und Wachstumsfaktoren miteinander [59].

1.3 Anatomie eines Gelenks

Bei einem Gelenk handelt es sich immer um eine bewegliche Verbindung von mindestens zwei Knochen. Beispielhaft wird hier im Folgenden auf die Anatomie und Physiologie der Fingergelenke eingegangen.

Die Fingergelenke lassen sich in drei Unterarten unterteilen. Die Fingergrundgelenke (*Articulationes metacarpophalangeae*) befinden sich zwischen Mittelhandknochen und Grundphalanx. Darauf folgen die Fingermittelgelenke (*Articulationes interphalangeae proximales*), welche Grund- und Mittelphalanx verbinden. Die Fingerendgelenke (*Articulationes interphalangeae distales*) befinden sich zwischen Mittel- und Endphalanx der Finger [60].

Die Fingergrundgelenke sind Kugelgelenke. Da sie jedoch von einem straffen Bandapparat umgeben sind, haben sie nur die Möglichkeit zu Flexion bzw. Extension sowie Abduktion oder Adduktion. Das Daumengrundgelenk bildet hier eine Ausnahme. Es ist genauso wie die Interphalangealgelenke ein Scharniergelenk [60].

Jedes echte Gelenk wird von einer Gelenkkapsel umgeben. Die äußere Schicht dieser Kapsel übernimmt die sensible Versorgung des Gelenks, während die innere Schicht, die *Membrana synovialis capsulae*, für die Produktion der Gelenkflüssigkeit verantwortlich ist. Die Synovialis, wie die epithelähnliche Gelenkinnenhaut auch bezeichnet wird, besteht aus ein bis zwei Schichten Typ B Synoviozyten, die auch als Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (eng. *human Fibroblast-like synoviocytes* (HFLS)) bezeichnet werden. Diese sind abwechselnd mit Typ A Synoviozyten angeordnet. Die genauen Unterscheidungsmerkmale dieser Synoviozyten sind in Kapitel 1.3.1 beschrieben. Im Gegensatz zu einem gewöhnlichen Epithel verfügt die Synovialis weder über *Tight-junctions* noch über eine Basalmembran. Dies macht sie besonders durchlässig und befähigt einen Austausch von Zellen oder Flüssigkeiten mit dem umliegenden Gewebe [61].

1.3.1 Synoviozyten

Synoviozyten sind spezifische Zellen der Synovialis, der Gelenkinnenhaut, und können in Synoviozyten Typ A und Typ B unterschieden werden. Während Typ A Synoviozyten spezifische Makrophagen sind und im Knochenmark gebildet werden, werden Typ B Synoviozyten als Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (HFLS) bezeichnet [61, 62]. HFLS sind mesenchymale Zellen, die große Ähnlichkeit mit Fibroblasten aufweisen. Im gesunden Gelenk kontrollieren HFLS die Produktion der extrazellulären Matrix des

Gelenks, wohingegen sie bei einer rheumatoiden Arthritis für das Fortschreiten der Erkrankung und der Entzündung mit verantwortlich sind. Man geht davon aus, dass sie sehr sensibel auf proinflammatorische Veränderungen der Immunzellen reagieren und es so zu einer Transformation ihrer Eigenschaften kommt. Eine andere Theorie besagt dagegen, dass eine Mutation der HFLS ursächlich für dieses Verhalten sein könnte [61, 63].

HFLS sezernieren diverse Proteine und Mediatoren, unter anderem, Proteine der extrazellulären Matrix, die Kollagene IV und V als auch Integrine und Integrin-Rezeptoren. Im Gegensatz zu gewöhnlichen Fibroblasten sind HFLS vor allem für ihre Produktion von UDP-Glukose 6-Dehydrogenase bekannt, welche für die Herstellung von Hyaluronsäure essentiell ist [61, 63].

1.4 Entzündliche Erkrankungen der Haut und Gelenke

1.4.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine chronisch rezidivierende Erkrankung der Haut, die mit inflammatorischen Prozessen einhergeht [23]. Charakteristisch sind rote, hyperkeratotische, plaqueförmige oder papulöse Veränderungen, die lokalisiert oder generalisiert auftreten können. Typische Lokalisationen sind hier die Ellenbögen, Knie oder der Haaransatz. Des Weiteren besteht der Verdacht einer Assoziation mit anderen autoimmunen Störungen, wie beispielsweise Fehlfunktionen der Glandula thyroidea oder anderen Hauterkrankungen wie Vitilligo [64, 65]. Psoriasis vulgaris und die atopische Dermatitis sind die zwei häufigsten chronischen Hauterkrankungen, wobei die atopische Dermatitis häufiger bei Kindern auftritt [21]. Gemeinsam haben die beiden Erkrankungen jedoch, dass T-Zell vermittelte Mechanismen ausschlaggebend für die jeweilige Pathogenese ist [55]. Circa 2 % der Population sind von Psoriasis betroffen, wobei es verschiedene Unterarten zu differenzieren gilt [21, 65].

Die Hautläsionen der Betroffenen weisen eine Infiltration von T-Zellen in der Dermis auf, die zusammen mit anderen Immunzellen die Differenzierung der Keratinozyten stören. Hierbei handelt es sich besonders um TH1-Zellen, die durch ihre vermehrte IFN- γ Produktion verantwortlich für die Ansammlung an Monozyten und Granulozyten in betroffenen Geweben sind [55]. Dies führt zu Verhornung und Hyperproliferation, wobei die Hautbarriere gestört ist und es exogenen Noxen leicht gemacht wird, in den Körper einzudringen [21]. Die übermäßige Proliferation der Keratinozyten, sowie die Akanthose, wird dem IL-22 als induzierender Faktor zugeschrieben, welcher vor allem durch TH17-Zellen produziert wird [23, 66].

Die inflammatorisch aktiven T-Zellen setzen außerdem zusätzlich IL-17 frei, welches die Proliferation der Keratinozyten zusätzlich fördert. Diese wiederum reagieren mit der Sezernierung von Chemokinen, Zytokinen und AMPs, welche ebenfalls proinflammatorisch wirken [67].

Generell handelt sich hierbei um eine durch Zytokine von TH1- und TH17-Zellen vermittelte Erkrankung. In den Hautläsionen von Psoriasis-Patienten ist außerdem eine erhöhte Expression der Gene zur Umsetzung von IL-17, IL-23 und IL-22 zu beobachten. Zudem ist bekannt, dass sowohl IL-17 als auch IL-22 in Keratinozyten eine Erhöhung der Genexpression von S100A8, S100A9, HBD2 und HBD3 zur Folge haben. Diese Gene sind für ihre antimikrobielle Wirkung bekannt [23].

1.4.2 Psoriasis-Arthritis

Die Psoriasis-Arthritis (PsA) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die bei 10 % der Patienten mit Psoriasis vorliegt. Sie ist nach der rheumatoiden Arthritis die am zweithäufigsten gestellte Diagnose in diesem Krankheitsbereich [65]. Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis (RA) liegen keine entzündlichen Prozesse im Bereich des vasculären Systems vor, allerdings geht das Krankheitsbild über die Entzündungen in Haut und Gelenken hinaus, da überdies auch der Urogenitaltrakt, lymphatische Gewebe und Sehnenansätze betroffen sein können. Man geht davon aus, dass die Läsionen in Haut und Gelenken unabhängig voneinander sind, da die Mehrheit der Patienten mit Psoriasis keine Arthritis entwickelt. Interessant ist, dass es einen Zusammenhang zu den psoriasistypischen Nagelveränderungen zu geben scheint, da diese bei 67-90 % der Betroffenen mit PsA auftreten und nur bei 41 % der Patienten mit Psoriasis [65, 68].

In 60 % der Fälle tritt eine PsA erst nach einer manifestierten Psoriasis auf, während ein zeitgleiches Auftreten von Hautläsionen und Gelenken, die eine Arthritis aufweisen, in 20 % der Fälle auftritt. In den seltensten Fällen sind die Gelenke als erstes betroffen [69]. Die radiologischen Befunde der PsA sind multiform. Von neu hervorgerufenen Ankylosen und knöchernen Auswüchsen im Gelenk bis zur Knochendestruktion zeigt sich ein variables Krankheitsbild [65]. Der Schweregrad der Erkrankung, sowie die Anzahl der betroffenen Gelenke, können sich stets verändern [70].

Man geht davon aus, dass es sich bei Psoriasis und der PsA um genetisch bedingte Erkrankungen handelt. Liegt eine Assoziation der PsA mit HLA-B37 vor, so hat der Verlauf der Erkrankung eine schlechte Prognose [70].

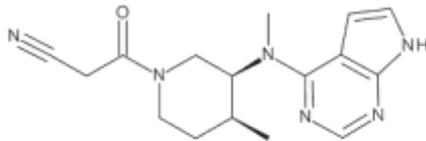
1.4.3 Rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch Gelenkzerstörung und Steifheit sowie Entzündung und Schmerzen charakterisiert ist [71]. Ca. 1 % der Bevölkerung sind von dieser Erkrankung betroffen, wobei meist eher die kleineren Gelenke von Händen und Füßen involviert sind [72]. Die RA ist gekennzeichnet durch eine Hyperplasie der Synovialis, der Gelenkhaut, die als Pannus bezeichnet wird und verantwortlich ist für die entzündlichen Prozesse im Rahmen der Erkrankung. Wo vorher nur 1-2 Zellschichten existierten, sind in erkrankten Gelenken nun 10-20 Zellschichten zu beobachten. Hierbei sind sowohl Typ A als auch Typ B Synoviozyten proliferiert. Mit der Bildung eines Pannus geht die Zerstörung des Knochens und des Knorpels einher. Man geht davon aus, dass es zuerst zu einer vermehrten Einwanderung von Typ A Synoviozyten kommt, die schließlich eine Proliferation der HFLS induzieren und so die

Entzündung induzieren. Dies ist damit zu erklären, dass Typ B Synoviozyten in der Lage sind, Zytokine und Entzündungsmediatoren zu sezernieren. Der entstandene Pannus lässt sich grob mit einem aus Makrophagen, Osteoklasten und HFLS bestehenden invasiven Tumor vergleichen, der Knorpel und Knochen zerstört. Des Weiteren können diverse histologische Veränderungen beobachtet werden, die sich in der inneren und der äußeren Schicht der Gelenkkapsel ereignen. Es kommt zu einer Produktion neuer Blutgefäße und diversen Autoantikörpern beispielsweise gegen Kollagene. Die lokale Entzündung besteht meist schon lange bevor die Patienten Schmerzen im betreffenden Gelenk wahrnehmen. Hierbei spielen die HFLS eine zentrale Rolle im Entstehen und Fortbestehen der Entzündung. [61, 63].

1.5 Medikament Tofacitinib

Tofacitinib (Handelsname Xeljanz®, Abb.5) ist ein oraler Janus Kinase (JAK) Inhibitor, der in der Therapie von PsA und RA eingesetzt wird. Auf zellulärer Ebene bedeutet dies, dass der JAK1- sowie der JAK3-Signalweg komplett und der JAK2-Signalweg teilweise inhibiert wird [71, 73-76].



Tofacitinib (Xeljanz, Pfizer); C₁₈H₂₂N₄O; MW = 312

Abb. 5: Struktur des Medikaments Tofacitinib

Dargestellt ist die molekulare Struktur des Medikaments Tofacitinib

Pharmakokinetisch ist Tofacitinib durch eine rasche Absorption und Elimination gekennzeichnet, wobei die maximale Plasmakonzentration (t_{max}) eine halbe bis ganze Stunde beträgt und die terminale Halbwertszeit ($t_{1/2}$) in drei Stunden erreicht ist. Normalerweise werden zweimal täglich jeweils 5 mg in Tablettenform eingenommen, was einer Tagesdosis von 10 mg entspricht [74].

Die JAKs gehören zu den Tyrosin-Kinasen, zu denen JAK1, JAK2, JAK3 und die TYK2 zählen. Diese sind für die Signalweitergabe über den Typ I und Typ II Zytokinrezeptor essentiell (Abb.6). Bindet ein entsprechendes Zytokin an den Rezeptor, so bewirkt die Aktivierung des JAK Signalwegs auch eine Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsfaktoren, die daraufhin eine Veränderung der Transkription im Nukleus bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass Tofacitinib an der Rezeptordomäne mit ATP um die Bindung konkurriert [76].

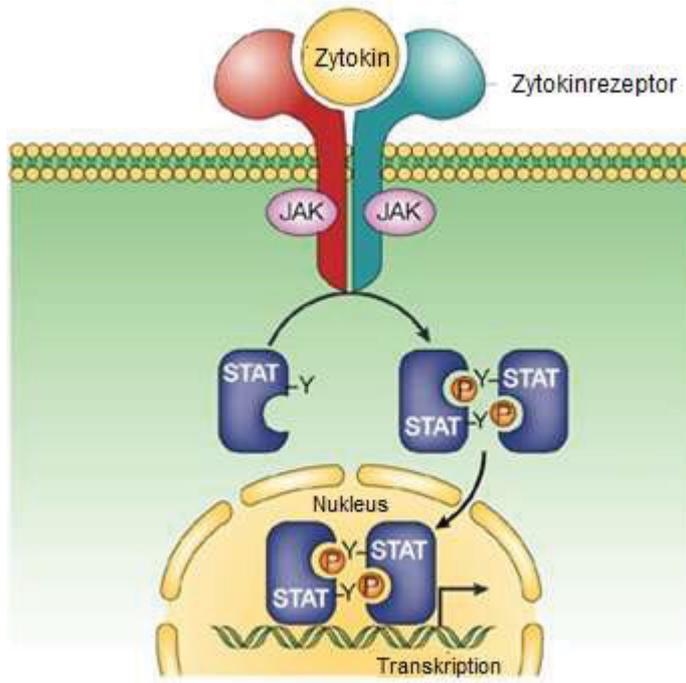


Abb. 6: JAK/STAT Signalweg

Der JAK/STAT-Signalweg beginnt durch die Bindung eines entsprechenden Zytokins an einen Typ-II-Zytokinrezeptor in der Zellmembran. An diesen Rezeptor sind intrazellulär zwei JAKs gebunden, die durch die Bindung eines Zytokins am Rezeptor aktiviert werden. Daraufhin phosphorylieren sie ein STAT, welches mit einem zweiten phosphorylierten STAT-Molekül dimerisiert und in den Nucleus einwandert, um hier aktiv in die Transkription einzugreifen. Modifiziert nach Shuai et Liu, 2003 [77].

Eine Besonderheit des JAK/STAT Signalwegs ist, dass die Aktivierung sehr schnell geschieht. Dies hat damit zu tun, dass die STATs rasch im Nucleus akkumulieren, sobald sie aktiviert sind. Eine Entfernung der aktivierten STATs aus dem Nucleus dauert dagegen mehrere Stunden und beinhaltet eine Dephosphorylierung sowie erneute Bereitstellung der inaktivierten STATs [78].

Dass Patienten, die unter RA leiden, gut auf eine Medikation mit Tofacitinib ansprechen, lässt sich durch die deutlich erhöhte Expression von JAK3, sowie STAT1, 4 und 6 in der Synovialis der Betroffenen erklären [79]. Eine Medikation mit Tofacitinib resultiert dementsprechend in einer Hemmung dieser übermäßigen Expression.

Zudem zeigte sich, dass Tofacitinib in der Lage ist, eine B-Zell induzierte Antikörperreaktion, wie beispielsweise bei einer Organtransplantation, zu verhindern, indem die B-Zellen in ihrer Proliferation gehemmt wurden. Hier wird ebenfalls der JAK/STAT Signalweg inhibiert [80].

1.5.1 Tofacitinib Nebenwirkungen

Patienten, die sich einer Therapie mit Tofacitinib unterziehen, können vermehrt Nebenwirkungen zeigen, denen eine virale oder bakterielle Infektion zu Grunde liegt.

Hierbei tritt der Herpes Zoster häufig ($\geq 1/100$ - $\geq 1-10$) auf, die Tuberkulose nur gelegentlich ($\geq 1/1000$ - $\geq 1/100$) [75].

Herpes Zoster

Herpes Zoster (Gürtelrose) ist eine virale Erkrankung, die die sensiblen Ganglien der Haut betrifft. Ausgelöst durch das humane Herpesvirus 3 (HHV3), dem VZV, betrifft es die Haut charakteristischer Weise entlang der Dermatome, da meist nur ein einzelnes Ganglion betroffen ist [81]. Es handelt sich hierbei um einen α -Herpes Virus, einen DNA Virus, der lebenslang in dem betreffenden Ganglion verweilt, nachdem eine primäre Infektion erfolgt ist. Auf diese Weise bildet sich eine Latenz aus. Der betroffene Bereich der Haut ist schmerzhaft und vesikulär verändert. Manchmal kommt es auch zu sogenannten post-herpetischen Neuralgien [82]. Wenn in seltenen Fällen ein weiteres Ganglion betroffen ist, liegt es meist auf der anderen Körperseite. Beim Herpes Zoster handelt es sich um eine Reaktivierung der persistierenden Viren, deren primärer Ausbruch meist im Kindesalter als Varizellen (Windpocken) auftritt. Während Varizellen in der Regel Kleinkinder betreffen, erkranken meist ältere Menschen oder Immunsupprimierte an Herpes Zoster, wobei eine Erkrankung in jüngeren Jahren nicht ausgeschlossen ist [81].

Tuberkulose

Tuberkulose ist eine bakterielle Erkrankung, die vorwiegend in Entwicklungsländern vorkommt und durch *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), ausgelöst wird. Die Erkrankung betrifft das Lungengewebe, aber auch andere Gewebearten können betroffen sein. Die Tatsache, dass alle 20 Sekunden ein Betroffener an Tuberkulose stirbt, macht die Erkrankung zur zweittödlichsten nach einer Infektion mit HIV. Allein im Jahr 2014 gab es weltweit 8,7 Millionen Neuerkrankungen zu verzeichnen [83]. Im Jahr 2015 starben 1.8 Millionen Menschen an den Folgen der Krankheit [84].

Nachdem infektiöse Luft eingeatmet wird, gelangt das Bakterium durch die Atemwege zur Lunge, wo es sich von den ortsständigen Makrophagen der Lungenalveolen phagozytieren lässt, um in ihnen zu verweilen. Während dieser Latenzphase sind Infizierte meist symptomlos [83].

Schließlich bilden sich charakteristische Granulome, die aus den betroffenen Makrophagen, dendritischen Zellen und einwandernden Makrophagen bestehen. B-Zellen, T-Zellen und neutrophile Granulozyten sind ebenfalls im Randsaum der Granulome zu beobachten. Die typischen Granulome sind der Grund, warum eine Medikation, aber

auch die körpereigene Immunabwehr, weniger Angriffspunkte haben. In den Granulomen sind die Bakterien geschützt vor äußeren Faktoren. Gegen die lytischen Eigenschaften der Makrophagen sind sie ebenfalls resistent, weshalb sie problemlos in ihnen verweilen können.

Eine Therapie mit dem Antibiotikum Rifampicin muss deshalb sehr lange durchgehalten werden [83].

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es herauszufinden, über welche molekularen Mechanismen sich eine JAK-Inhibition auf die antivirale bzw. antimikrobielle Infektabwehr *in vitro* auswirkt. Hierzu soll erstens untersucht werden wie sich Keratinozyten und Synoviozyten unter direkter JAK-Inhibition verhalten (Abb.7). Neben den direkten Effekten auf Keratinozyten und Synoviozyten, sollen die Effekte der Überstände Tofacitinib behandelte T-Zellkulturen auf die Genexpression der strukturellen Zellen untersucht werden. Das Augenmerk wird jeweils auf die Produktion antiviraler und antimikrobieller Peptide gelegt. Zweites Ziel ist die Analyse der antiviralen und antimikrobiellen Antwort von T-Zell unter JAK-Inhibition. Drittens und abschließend ist herauszufinden, ob sich naive CD4+ T-Zellen unter JAK-Inhibition in einen klassischen oder pathogenen TH17-Zelltyp differenzieren.

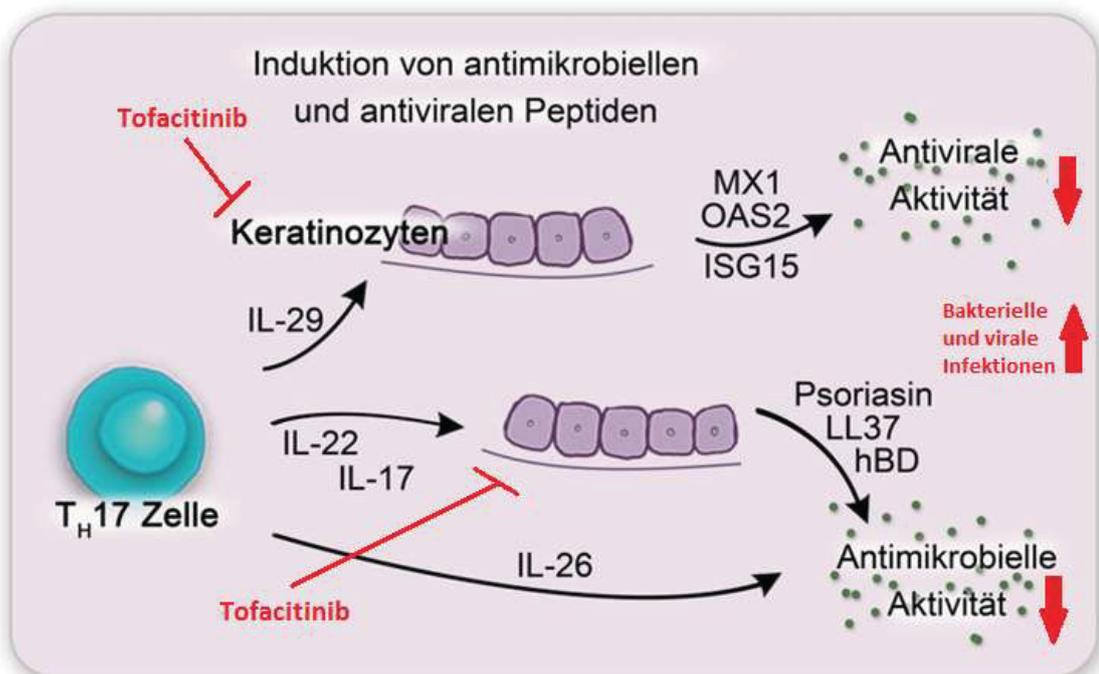


Abb. 7: Hypothese

Die Hypothese zu dieser Doktorarbeit ist, dass durch die Zugabe von Tofacitinib die Wirkung der TH17-Zytokine auf Keratinozyten und auch auf Synoviozyten nicht mehr gegeben ist. Dies ist durch die Hemmung des JAK/STAT-Signalweges durch Tofacitinib in der Membran der Keratinozyten und Synoviozyten zu begründen. Als direkte Reaktion wird die Sekretion von antimikrobiellen und antiviralen Peptiden vermindert und es kommt im Umkehrschluss zu vermehrten bakteriellen und viralen Infektionen. Beispielhaft wird hier die hypothetische Wirkweise auf Keratinozyten gezeigt. Quelle: eigene Darstellung.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat die Durchführung der Studie unter der Studiennummer 5775R genehmigt.

2.2 PBMC Isolation

Die Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC)) erfolgte, je nach Verwendungszweck, auf zwei verschiedene Arten.

Die erste Art ist die Isolation der PBMCs aus einem sogenannten *Buffy Coat*. Als *Buffy Coat* wird die Leukozyten- und Thrombozytenschicht bezeichnet, die sich ergibt, wenn man entnommenes Vollblut unter Zugabe von Gerinnungshemmern wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Heparin zentrifugiert [85]. Der *Buffy Coat* befindet sich dann zwischen der Plasma- und der Erythrozytenschicht und macht nur einen sehr geringen Anteil des Vollblutes aus. Für Transfusionen werden meist nur das Blutplasma oder die Erythrozyten benötigt, weshalb der *Buffy Coat*, mit Ausnahme zur Verwendung als Thrombozytenkonzentrat, eher als Nebenprodukt betrachtet wird. Alle *Buffy Coats* wurden aus der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen.

Zur Isolation von PBMCs aus einem *Buffy Coat* wurde dieser zuerst in eine 250 ml Zellkulturflasche überführt und mit phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *Phosphate buffered saline* (PBS)) auf ein Volumen von 125 ml aufgefüllt. Daraufhin wurden vier 50 ml Falcon™ Zentrifugenröhrchen mit jeweils 15 ml Ficoll-Paque PLUS gefüllt. Zusätzlich wurde dann in jedes Röhrchen vorsichtig 30 ml der Mixtur aus PBS und *Buffy Coat* geschichtet. Im nächsten Schritt erfolgte eine 10-minütige Zentrifugierung bei 1150 Umdrehungen pro Minute (engl. *revolutions per minute* (rpm)) und Raumtemperatur (RT), wobei das Tempo nur langsam erhöht wurde und die Bremse ausgestellt blieb. Die dabei entstandene Lymphozytenschicht wurde abgenommen und die Zellen aus jeweils zwei Röhrchen wurden in ein neues zusammengeführt, sodass die Lymphozyten aus vier Röhrchen schlussendlich auf zwei aufgeteilt wurden. Der Inhalt wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Diesmal erfolgte die Zentrifugierung bei 970 rpm für 10 min. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in ein Röhrchen zusammengeführt, sodass 25 ml isotonischer Amminiumchlorid-Lösung (Lyse Puffer) hinzugegeben werden konnte. Daraufhin inkubierten die Zellen 10 min lang im Kühl-

schränk. Um die Lysereaktion zu stoppen, kamen erneut 25 ml PBS hinzu. Wieder zentrifugierten die Zellen bei 970 rpm 10 min lang. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die pelletierten PBMCs in 50 ml PBS resuspendiert, um die Zellen im nächsten Schritt zählen zu können. Nach Bestimmung der Zellzahl konnte dann mit der Isolation spezifischer Zelltypen aus den PBMCs fortgefahren werden.

Für eine andere Art der PBMC Isolation benötigt man sogenannte *Cell Preparation Tubes* (CPT). Diese CPT-Röhrchen haben eine integrierte Schicht aus FICOLL™ und einem speziellen Gel, welche es ermöglicht PBMCs von den restlichen Zellen des Blutes zu trennen. Die herkömmliche Weise, PBMCs mit Hilfe einer Schichtung auf FICOLL™ zu isolieren, wird so umgangen. Vorteilhaft ist ebenfalls, dass die Blutentnahme direkt in die CPT Röhrchen erfolgt und diese direkt zentrifugiert werden können [86].

Für die Gewinnung von PBMCs mit Hilfe von CPT Röhrchen wurden immer jeweils vier Röhrchen Venenblut von gesunden Probanden in der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf entnommen. Diese Anzahl Röhrchen war notwendig, um eine ausreichende Menge an Zellen zu gewährleisten, da sie speziell für die Durchführung des Lymphozytenaktivierungstests (LAT) verwendet wurden. Nach der Blutentnahme kamen die CPT Röhrchen für 20 min bei RT und 2500 rpm in die Zentrifuge, wobei eine Beschleunigung von 9 gewählt und die Bremse auf 1 (fast ungebremst) eingestellt wurde. Die entstandene Lymphozytenschicht wurde zusammen mit dem Blutplasma entnommen und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Der Inhalt wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, um erneut zentrifugiert zu werden, diesmal 10 min bei RT und einer Umdrehung von 1250 rpm. Im nächsten Schritt musste der Überstand verworfen werden, um das entstandene Pellet aus Zellen in 10 ml Lyse Puffer zu lösen und für 10 min im Kühlschrank bei 4 °C zu inkubieren. Um die Lysereaktion zu stoppen, kamen 40 ml PBS hinzu. Eine erneute Zentrifugierung für 10 min bei 1250 rpm und RT ließ im letzten Schritt ein Pellet aus PBMCs entstehen, welches nach der Abnahme des Überstandes in 1 ml RPMI Medium wieder aufgelöst wurde, bevor die genaue Zellzahl bestimmt werden konnte.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten wurden aus Vorhaut oder Bauchgewebe isoliert. Bei sowohl der verwendeten Vorhaut als auch dem Bauchgewebe handelt es sich um ein (anonymisiertes) medizinisches Abfallprodukt. Die Isolation der Keratinozyten aus den genannten Geweben wurde routinemäßig von Laborassistenten durchgeführt und die Keratinozyten bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Kultivierung

Als Kultivierung von Zellen wird deren Vermehrung und Wachstum außerhalb eines Organismus unter Zugabe von Nährmedium bezeichnet. Die Kultivierung der primären Keratinozyten erfolgte stets höchstens bis zur dritten Passage.

Um die eingefrorenen Zellen nutzen zu können, mussten sie aufgetaut werden. Hierzu mussten sie schnell im Wasserbad erwärmt und mit 14 ml erwärmten serum-freien Medium für Keratinozyten („*Keratinocyte-SFM*“, Gibco) angereichert mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und *Bovine Pituitary Extract* in ein 15 ml Falcon Röhrchen pipettiert werden. Es folgte eine 8-minütige Zentrifugierung bei einer Umdrehung von 1250 rpm und RT. Der Überstand wurde anschließend verworfen, um die Reste des Einfriermediums zu entfernen, die Zellen in frischem Medium zu resuspendieren und in eine 175 cm² Zellkulturflasche (Greiner CELLSTAR[®] flask) zu geben. Das Volumen konnte nun auf insgesamt 30 ml mit Medium aufgefüllt werden. Die Zellkulturflasche wurde nun im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert und für rund eine Woche nicht bewegt, um zu gewährleisten, dass die Keratinozyten am Flaschenboden anwachsen. Danach wurde das Wachstum der Keratinozyten regelmäßig unter dem Mikroskop überwacht.

Um zu gewährleisten, dass genügend Platz für die stetig wachsende Zellzahl zur Verfügung steht, mussten die Keratinozyten, sobald sie den Boden der Zellkulturflasche ausreichend bewachsen hatten (ca. 80 % Konfluenz), auf mehrere Flaschen aufgeteilt werden (sogenanntes *splitten*).

Hierfür wurde im ersten Schritt das alte Medium abgenommen und verworfen. Im Anschluss kamen 20 ml PBS auf die Zellen, um sie zu waschen. Neun ml Accutase (Dispase von PanBiotech) wurden als nächstes hinzugegeben, um die Keratinozyten vom Flaschenboden zu lösen. Nun konnte vorsichtig an die Flasche geklopft werden,

um das Ablösen der Zellen zu unterstützen und zu beschleunigen. Bis die Zellen vollständig abgelöst waren vergingen einige Minuten, wobei zwischendurch immer unter dem Mikroskop kontrolliert wurde, wie weit der Prozess bereits fortgeschritten war. Nachdem alle Zellen abgelöst waren wurden sie mit 20 ml PBS abgespült und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Zur Zellsuspension kam PBS hinzu, bis 50 ml erreicht waren. Das Röhrchen wurde bei RT 8 min lang bei 1250 rpm zentrifugiert, so dass der Überstand anschließend abgenommen und verworfen werden konnte. Schließlich kamen 5 ml Keratinozyten Medium hinzu, damit die Zellen resuspendiert und gezählt werden konnten. Pro bewachsener Flasche ist eine Zellzahl von ungefähr 4×10^6 zu erwarten.

Ausplattieren

Bevor die Keratinozyten in die jeweiligen Zellkulturplatten gegeben werden konnten, musste die Zellzahl bestimmt werden. Zur Vorbereitung des Zählens wurden 10 μ l der Zellsuspension in dem Ansatz einer 96-Lochplatte mit 90 μ l Trypanblau vermischt, um die Zellen anzufärben und sie um den Faktor 10 zu verdünnen. In einem nächsten Schritt wurden 10 μ l der Mischung erneut mit 90 μ l Trypanblau verdünnt (100-fache Verdünnung). Beim Zählen kam die Einwegzählkammer (C-Chip) von Biochrome zum Einsatz, die einen Verdünnungsfaktor (Volumenfaktor) von 10^4 besitzt. In diese Zählkammer wurden dann 10 μ l der Zellsuspension hinein pipettiert und die Zellen ausgezählt. Schlussendlich betrug der Verdünnungsfaktor also 10^6 .

Beim Aussähen der Keratinozyten auf eine Zellkulturplatte ist eine Anzahl von 4000 Zellen/cm² anzustreben. Daraus ergibt sich dann die benötigte Gesamtzellzahl von $1,1 \times 10^6$ Zellen für sechs 12-Lochplatten mit einer Oberfläche von 3,8 cm² (4000 Zellen \times 3,8 cm² \times 72 Ansätze). Nach der Verteilung der Zellen in den jeweiligen Platten, wurden diese bei 37 Grad und 5 % CO₂ im Inkubator gelagert.

Stimulationsbedingungen

Die Stimulation der Keratinozyten mit Tofacitinib erfolgte für die spätere Genexpressionsanalyse. In den mit Keratinozyten versetzten 12-Lochplatten wurde zuerst das alte Zellkulturmedium abgenommen und durch 980 μ l neues SFM Medium ersetzt. Die 12-Lochplatten wurden so eingesetzt, dass immer sechs Bedingungen auf einer Platte Platz fanden, also jede Bedingung doppelt vorkam. Hierbei war die Anordnung so, dass die Gleichen Bedingungen immer nebeneinander in einer Zeile vorkamen.

Jede getestete Komponente wurde einmal allein und mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Tofacitinib (600 nM und 100 nM Tofacitinib) auf die Zellen gegeben.

Tofacitinib ohne weitere Stimulanzen musste jeweils in beiden Konzentrationen als Kontrolle getestet werden. Ebenfalls als Kontrolle dienten zwei Ansätze, in denen nur Medium zugegeben wurde und zwei Ansätze, in denen die DMSO Konzentration 600 nM betrug. Hierbei sollte kontrolliert werden, ob DMSO, in seiner Eigenschaft und Konzentration als Lösungsmittel von Tofacitinib, die Genexpression verändert.

Nach dem oben beschriebenen Wechsel des Mediums wurde zunächst entweder 6 µl oder 1 µl Tofacitinib als auch 6 µl DMSO zu den Zellen gegeben, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 min im Inkubator. Im Anschluss wurde von jeder Komponente/jedem Stimulanz jeweils 1 µl hinzu pipettiert, wobei Varizella vaccine mit 10 µl die einzige Ausnahme darstellte. Die hieraus resultierenden finalen Konzentrationen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die anschließende Inkubationszeit betrug 24 h.

Stimulanzen	Konzentration
Tofa	600 nM
Tofa	100 nM
DMSO	600 nM
LPS	1 µg/ml
LTA	1 µg/ml
IL-17	100 ng/ml
IFN- γ	100 ng/ml
IL-29	100 ng/ml
IL- 22	100 ng/ml
LAM- Mtb	1 µg/ml
Esat- 6 + CFP 10	je 100 ng/ml
Varizella vaccine	1 µg/ml
Vzv gE	100 ng/ml
Vzv IE63	100 ng/ml

Tabelle 1: Keratinozyten Stimulanzen für Genexpression mit Angabe der finalen Konzentration

Tofacitinib und DMSO kamen 60 min vor den anderen Stimulanzen auf die Zellen, die übrigen Substanzen kamen im Nachhinein hinzu. Hierbei entspricht: LPS= Lipopolysaccharide, LTA= Lipoteichonsäure, IL-17= Interleukin-17, IFN-γ= Interferon-γ, IL-29= Interleukin-29, LAM-Mtb= Lipoarabinomannan tuberculosis, Esat-6 + CFP-10= komplexierte Moleküle, die von Mycobakterien sezerniert werden, Varizella vaccine= Varizellen Impfstoff, Vzv gE= Oberflächenmolekül auf Varizellen, Vzv IE63= Latenzprotein der Varizellen

Einen Tag später erfolgte die so genannte „Zellernte“. Hierfür musste das überstehende Medium abgenommen und in 2 ml Eppendorf Röhrchen gesammelt sowie bei -20 °C eingefroren werden. Die Zellen wurden mit 350 µl einer Mischung aus RLT-Puffer (aus RNeasy Mini Kit Kapitel 2.5) und β-Mercaptoethanol vom Boden der Lochplatte abgelöst und lysiert. Hierfür mussten im Vorhinein 10 ml RLT und 100 µl β-

Mercaptoethanol vermengt werden. Die lysierten Keratinozyten wurden in einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen bei -20 °C für eine anschließende RNA-Isolation eingefroren.

2.3.2 Synoviozyten

Kultivierung

Für die Zellkultur der humanen Fibroblast-ähnlichen Synoviozyten, (engl. *Human Fibroblast-like-synoviocytes* (HFLS)) wurde ein Kit bestehend aus 5×10^5 Zellen, Medium (*Synoviocyte growth medium*) und Flüssigkeiten zum Splitten der Zellen (*Subculture Reagents*) bestellt (Cell Applications, Inc). Die HFLS wurden aus Gelenken gesunder Menschen gewonnen. Bei der Lieferung befanden sie sich in einem kälte-konservierten Fläschchen, dem Transportmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (engl. *Fetal bovine serum* (FBS)) und 10 % DMSO zugesetzt wurde. Es handelte sich um Zellen der zweiten Passage. Bis zur Benutzung wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

Um mit der Zellkultur starten zu können, wurden die HFLS im ersten Schritt aufgetaut. Dies wurde anhand des Protokolls des Herstellers der Zellen durchgeführt. Zu Beginn wurde eine T-75 Zellkulturflasche (Greiner CELLSTAR® flask) vorbereitet, in welche 15 ml warmes HFLS Medium hinzugefügt wurde. Die Zellen mussten schnell im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt werden, bis nur noch eine kleine Menge des Inhalts gefroren war. Die Zellen wurden dann durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und schließlich der mit Medium gefüllten Zellkulturflasche hinzugefügt. Diese wurde bei 37 °C im Inkubator gelagert. Um ein Festwachsen der Zellen am Boden der Flasche zu gewährleisten, sollten die HFLS 24 h lang nicht gestört werden. Es folgte ein täglicher Mediumwechsel. Als der Boden zu 60 % bewachsen war, wurde die Menge des zugesetzten Mediums verdoppelt, sodass nun immer 30 ml Medium gewechselt wurden.

Splitten

Als die HFLS 80 % der Fläche bedeckten, sollte laut Herstellerprotokoll das *Splitten* begonnen werden. Hierfür wurden zunächst alle Substanzen, die benötigt wurden, aufgetaut. Das alte Medium musste abgenommen und die fest gewachsenen HFLS mit 15 ml *Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS) gewaschen werden. Als nächstes wurden 10 ml Trypsin/EDTA in die Flasche pipettiert, um die Zellen zu lösen. Neun ml der Lösung mussten jedoch sofort wieder entfernt werden. Das Ablösen der HFLS dauerte zwei bis fünf min. Durch leichtes Klopfen und Schwenken wurde das Ablösen beschleunigt und die Zellen änderten ihre Gestalt von fibroblastär zu rund. Um die Reaktion zu stoppen, kamen zweimal nacheinander fünf ml *Trypsin Neutralization Solution*

in die Zellkulturflasche. Die Zellsuspension wurde beide Male in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und die Flasche auf übrig gebliebene HFLS überprüft. Die Zentrifugierung erfolgte für fünf min bei 1020 rpm und RT, um ein Pellet aus Zellen zu gewinnen, welches im Anschluss in 1 ml Medium gelöst wurde.

Die HFLS konnten nun gezählt und dementsprechend weiter verwendet werden.

Ausplattieren

Die Zellzahlbestimmung erfolgte analog zu den Keratinozyten, jedoch wurden die HFLS nur um den Faktor 10 verdünnt.

Für eine 12-Lochplatte wurden 38000 Zellen/ ml benötigt, was bei 6 Platten einer Gesamtzellzahl von $2,736 \times 10^6$ Zellen entsprach.

Bei einer 96-Lochplatte benötigte man 32000 Zellen/ ml, was in einer Gesamtzahl von $0,32 \times 10^6$ Zellen pro Platte resultierte.

Stimulationsbedingungen

Die Stimulation der HFLS mit Tofacitinib erfolgte analog der Stimulation der Keratinozyten (Kapitel 2.3.1). Hierbei wurden ebenfalls 12-Lochplatten benötigt. Zuerst musste das alte Medium entfernt werden, um 990 µl neues HFLS Medium hinzufügen zu können.

Auch hier wurde jede Komponente einmal alleine und einmal zusammen mit Tofacitinib in den Konzentrationen 600 nM oder 100 nM, auf die HFLS gegeben. Tofacitinib alleine, sowie Medium als auch DMSO fungierten als Kontrollen. Die HFLS wurden ebenso wie die Keratinozyten, 60 min mit Tofacitinib vorinkubiert, bevor die Stimulanzen hinzukamen. Die HFLS wurden genauso stimuliert wie die Keratinozyten (siehe Tabelle 1) mit der Ausnahme von Varizella vaccine, VzV gE and VzV IE63.

Die Zellernte zusammen mit dem Sammeln des Zellkulturüberstandes erfolgte analog zu den Keratinozyten nach 24 h Inkubation.

2.3.3 T-Zellen

Um T-Zellen zu gewinnen wurde die PBMC Isolation aus *Buffy Coats*, wie in Kapitel 2.2. beschrieben, durchgeführt. Als Vorbereitung wurde RPMI Medium mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin (P/S) sowie 10 % fetalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum* (FCS)) auf RT gebracht.

Die PBMCs wurden gezählt, da 200×10^6 Zellen für den weiteren Verlauf benötigt wurden.

10 μ l der in PBS gelösten PBMCs wurden in dem Ansatz einer 96-Lochplatte mit 90 μ l Trypanblau vermischt, um sie anzufärben und die Zellen um den Faktor 10 zu verdünnen. In einem nächsten Schritt mussten 10 μ l der Mischung erneut mit 90 μ l Trypanblau verdünnt werden. Beim Zählen wurde wie schon bei Keratinozyten und HFLS eine Einwegzählkammer verwendet, die einen Verdünnungsfaktor (Volumenfaktor) von 10^4 besitzt. 10 μ l der Zellsuspension wurden hinein pipettiert und die Zellen ausgezählt. Schlussendlich betrug der Verdünnungsfaktor also 10^6 .

CD4+ T-Zell Isolation

Nachdem die richtige Menge an PBMCs in ein neues Falcon Röhrchen gefüllt wurde, begann die Zentrifugierung bei RT und 1250 rpm für 8 min. Der Überstand musste abgenommen und verworfen werden und die Isolation der CD4+ T-Zellen konnte mit Hilfe des *Naïve CD4+ T cells Isolation Kitt II* (Miltenyi Biotec) durchgeführt werden. Dieses Kit enthält Biotin-gekoppelte Antikörper gegen eine Reihe von Oberflächenmolekülen, außer CD4, sowie magnetische Mikrokügelchen, die an das Biotin binden können. Damit ermöglicht das Kit die magnetische Beladung und darauffolgende Isolierung von naiven CD4+ T-Zellen mittels der *Magnetic-activated cell sorting* (MACS) Technologie. Zuerst wurden die Zellen in 800 μ l *MACS Buffer* resuspendiert. Im nächsten Schritt kamen 200 μ l des *Naive CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II* hinzu. Beide Flüssigkeiten mussten gut durchmischt werden und die gesamte Suspension kam für 5 min in den Kühlschrank. Nach Ablauf der Zeit wurden 600 μ l *MACS Buffer* hinzu pipettiert. Als nächstes mussten 400 μ l *Naive CD4+ T Cell Microbead Cocktail II* dazu gegeben werden und erneut inkubierte die Mixtur daraufhin im Kühlschrank, diesmal jedoch für 10 min. In der Zwischenzeit wurden zwei 15 ml Falcon Röhrchen vorbereitet.

Für die weitere Durchführung kam der *autoMACS Pro Separator* für die magnetische Isolation zum Einsatz. Das Röhrchen mit der Suspension aus Zellen und Zusätzen wurde in das Gerät gestellt. Das Programm *Depletes* musste eingestellt werden, damit die unberührten CD4+ T-Zellen schlussendlich in ein zuvor leeres Röhrchen eingefüllt wurden. Die gewünschten Zellen wurden erneut zentrifugiert. Die Einstellung war hierbei 1250 rpm bei RT und einer Dauer von 8 min. Der Überstand wurde abpipettiert und entsorgt, das übrige Pellet in 1 ml RPMI Medium gelöst. Ein erneutes Zählen der Zellen war notwendig, um mit einer Zellzahl von 15×10^6 Zellen und einer Konzentration von

5×10^6 Zellen /900 μ l weiter arbeiten zu können. Die Konzentration wurde erreicht, indem insgesamt 2700 μ l Medium zum Einsatz kamen.

Im nächsten Teil des Versuchs wurden die CD4+ T-Zellen aktiviert. Hierfür wurde das *Human T Cell Activation/Expansion Kit* (Miltenyi Biotec) eingesetzt. Ein neues 15 ml Falcon Röhrchen wurde mit 75 μ l *MACSiBead Particles* und 600 μ l RPMI Medium befüllt. Es folgte eine erneute Zentrifugierung für 5 min bei 1250 rpm, woraufhin der resultierende Überstand im Röhrchen verworfen werden konnte. Resuspendiert wurde mit 300 μ l neuem RPMI Medium. Schließlich kamen die 2700 μ l aus CD4+ T-Zellen und RPMI Medium zu den *MACSiBead* Partikeln hinzu. 3 ml RPMI Medium mussten dazu pipettiert werden, um auf eine Gesamtmenge von 6 ml zu kommen und eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml zu erreichen.

Stimulation und Differenzierung

Für die Stimulation wurde eine 24-Lochplatte verwendet, wobei pro *Buffy Coat* vorerst sechs (später weitere sechs) Ansätze nötig waren. Dementsprechend konnten immer zwei verschiedene Stimulationen nebeneinander auf einer Platte durchgeführt werden. Die sechs ml Zellsuspension wurden gleichmäßig auf sechs Ansätze aufgeteilt. Um die Stimulation zu beginnen, kamen zunächst Tofacitinib (600 oder 100 nM) und DMSO (600 nM) in die entsprechenden Ansätze. Es folgten 30 min Inkubationszeit bei 37 °C. Im Anschluss wurden die restlichen Komponenten hinzugefügt, um eine Differenzierung der T-Zellen Richtung TH17-Zellen auszulösen. Hierbei handelte es sich um Transformierender Wachstumsfaktor- β 1, (engl. *Transforming growth factor- β 1*, (TGF β 1) (final: 20ng/ml)), Interleukin-6 (IL-6) und IL-23. Alle finalen Konzentrationen sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die Zellen wurden dann drei Tage bei 37 °C inkubiert.

Stimulanzen	Konzentration
Tofa	600 nM
Tofa	100 nM
DMSO	600 nM
IL- 6	20 ng/ ml
IL- 23	10 ng/ ml
TGF β 1	20 ng/ ml

Tabelle 2: T-Zell Stimulanzen für Genexpression mit Angabe der finalen Konzentration

Tofacitinib und DMSO kamen bereits 30 min vor den anderen Stimulanzen auf die Zellen, die übrigen Substanzen kamen im Nachhinein hinzu. Abkürzungen: DMSO= Dimethylsulfoxid und IL = Interleukin

Zellfütterung (*Feeding*)

Das so genannte *Feeding* der T-Zellen, beschreibt das Aufteilen der Zellen auf zwei Ansätze und die Zugabe einer weiteren Stimulanzie.

Nach drei Tagen Inkubationszeit mussten die T-Zellen aufgeteilt und gefüttert werden, da die zugesetzten Substanzen nun verbraucht waren. Zunächst wurde damit gestartet die Zellen auf- und ab zu pipettieren, um eine gleichmäßige Suspension herzustellen. Die Hälfte der Zellen (500 µl) kamen daraufhin in einen separaten Ansatz, die Zellen wurden also aufgeteilt. Im Anschluss wurden 12 ml RPMI Medium in ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben und 12 µl IL-2 hinzugefügt. Es ergab sich eine Konzentration von 10 ng/ ml. Fünfhundert µl dieser Mischung kamen zur Zellsuspension hinzu, was einer finalen Konzentration des IL-2 von 5 ng/ ml entsprach. Hierauf folgte erneut eine Inkubationszeit von vier Tagen bei 37 °C.

Am insgesamt siebten Tag fand die Zellernte statt. Da es sich bei T-Zellen um Suspensionszellen handelt, konnten die Zellen nicht direkt von der 24-Lochplatte abgeerntet werden, da sie nicht am Boden festgewachsen waren. Um das Medium abnehmen zu können, wurden die Zellen abermals resuspendiert und die Zellen aus den Ansätzen mit jeweils gleicher Stimulationsbedingung kamen zusammen in ein zwei ml Eppendorf Safe-Lock Tube. Es folgte die Zentrifugierung für acht min bei RT und 1250 rpm.

Der Überstand konnte vorsichtig abgenommen und wie gewohnt eingefroren werden, die übrigen Zellen wurden in 350 µl der Mischung aus RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol resuspendiert und für die RNA-Isolation eingefroren.

2.3.4 Stimulation mit Zellkulturüberständen

In einer Variante der oben beschriebenen Zellstimulationen wurden Keratinozyten und HFLS mit dem Zellkulturüberstand der T-Zell-Experimente stimuliert. Hierfür wurden 12-Lochplatten benutzt, in die jeweils HFLS oder Keratinozyten ausgesät wurden. Bei den Überständen handelt es sich um den nach der Zellernte eingefrorenen Zellkulturüberstand der neun verschiedenen T-Zell-Experimente.

Für die Durchführung mussten im Vorhinein 12-Lochplatten mit Zellen bewachsen werden. Nach ca. einer Woche im Inkubator bei 37 °C, in der ein Mediumwechsel an jedem zweiten Tag erforderlich war, waren die Zellen dicht genug gewachsen, um mit der Stimulation beginnen zu können. Hierfür mussten die Überstände aufgetaut und im Anschluss gründlich gemischt werden. Zusätzlich war eine Entfernung des alten Medi-

ums in den Lochplatten erforderlich. Den HFLS wurde daraufhin 900 µl DMEM HFLS Medium hinzugefügt, bei den Keratinozyten kamen 900 µl SFM Keratinozyten Medium hinzu. Als Kontrolle kam 100 µl frisches RPMI Medium in Duplikaten auf die Platten. Auf die übrigen Platten kamen jeweils 100 µl T-Zell-Überstand wieder im Duplikat.

Stimulanzen
RPMI Medium
Medium
DMSO 600 nM
Tofa 600 nM
Tofa 100 nM

Tabelle 3: T-Zell-Überstände auf Keratinozyten oder HFLS

Als unbehandelte Kontrolle diente 100 µl frisches RPMI Medium. Bei den übrigen Stimulanzen bezieht sich die Angabe auf die Bedingungen mit denen die T-Zellen vor der Zellernte stimuliert wurden. Hierbei waren Medium und DMSO erneut als Kontrollen gedacht, um den Einfluss von Tofacitinib in den verschiedenen Konzentrationen beurteilen zu können.

Nach Zugabe der Überstände und des Mediums, folgte eine Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C im Inkubator. Wie bei den übrigen Keratinozyten- und HFLS-Experimenten, erfolgte auch hier im Anschluss die Zellernte zusammen mit dem Sammeln des Zellkulturüberstandes.

2.4 Zellvitalitätsassays

Die zwei im folgenden beschriebenen Vitalitätsassays dienen dazu herauszufinden, ob das Medikament Tofacitinib oder dessen Lösungsmittel DMSO in der verwendeten Konzentration Einfluss auf die Zellvitalität der verwendeten Zellen (Keratinozyten, HFLS oder T-Zellen) haben.

2.4.1 MTT-Assay für Keratinozyten

Der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (*MTT*)-Assay ist der Goldstandard zur Testung der metabolischen Aktivität der Zellen. Der Farbstoff MTT, ein Tetrazoliumsalz, wird von den lebenden Zellen umgesetzt, sodass ein Farbumschlag von gelb auf violett erfolgt. Der Grad der Färbung zeigt hierbei den Grad der Vitalität der Zellen an. Auf diese Weise ist es möglich nachzuweisen, ob eine Substanz zytotoxisch ist oder nicht. MTT wird mit PBS auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt, steril filtriert und dunkel gelagert [87].

Der *MTT*-Assay wurde zur Testung der Zellvitalität von Keratinozyten in Gegenwart von Tofacitinib eingesetzt.

Die Keratinozyten wurden in einer sterilen, farblosen 96-Lochplatte mit flachem Boden kultiviert, wobei pro Loch 100 µl Keratinozyten in SFM Medium hinzugegeben wurde. Da die optimale Dichte der Keratinozyten bei der Aussaat 4000 Zellen/cm² beträgt, entspricht dies 1280 Keratinozyten pro Ansatz mit einer Oberfläche von 0,32 cm². Die Lagerungszeit im Inkubator betrug rund eine Woche, um ein ausreichendes Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Nachdem die Zellen dicht genug gewachsen waren, erfolgte die Stimulation für den *MTT*-Assay. Hierfür wurden Tofacitinib und DMSO mit Hilfe einer Verdünnungsreihe auf verschiedene Konzentrationen von 10 bis 0,05 µM gebracht. Die Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe von 2 ml Eppendorf Röhrchen durchgeführt. Nachdem das alte Medium über den Keratinozyten entfernt war, kamen jeweils 100 µl der beiden in Medium verdünnten Substanzen in absteigender Konzentration hinzu.

Alle Stimulationsbedingungen wurden in jeweils vier Ansätzen durchgeführt.

Finale Konzentration	Tofa Verdünnung	SFM Medium	DMSO Verdünnung	SFM Medium
10 µM	2 µl	1998 µl	2 µl	1998 µl
5 µM	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl
1 µM	300 µl	1200 µl	300 µl	1200 µl
0,6 µM	360 µl	240 µl	360 µl	240 µl
0,5 µM	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl
0,1 µM	300 µl	1200 µl	300 µl	1200 µl
0,05 µM	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl
0,0 µM		1200 µl		1200 µl

Tabelle 4: MTT-Verdünnungsreihe von Tofacitinib und DMSO.

Hierbei ist in der ersten Zeile jeweils die Ausgangskonzentration zu erkennen. Aus dem ersten Röhrchen wurde die jeweilige Menge in das zweite Röhrchen überführt und auf- und abpipettiert. Das Vorgehen wurde mit den übrigen Röhrchen weitergeführt. Die einzige Ausnahme stellte das 0,6 µM Röhrchen dar, dessen Zeile hier grau hinterlegt ist. Die Verdünnung erfolgte zwar in dieses Röhrchen aus dem 1 µM Röhrchen, allerdings diente es nicht als Ausgangslage für die weitere Verdünnung. Die jeweilige Menge für das 0,5 µM Röhrchen wurde dem 1 µM Röhrchen entnommen.

Zur Kontrolle wurden auch Ansätze nur mit Medium und mit 5 % DMSO, was in dieser Konzentration zytotoxisch ist, versetzt.

Die stimulierten Zellen kamen für 24 h bei 37 °C in den Inkubator. Am nächsten Tag erfolgte die Durchführung des eigentlichen *MTT*-Assays. Fünfundzwanzig µl der *MTT*-Lösung (5 mg/ml), bestehend aus 50 mg *MTT* Salz, welches in 10 ml PBS aufgelöst wurde, kamen in jeden Ansatz hinzu. Nach einer Inkubationszeit von 2 h im Inkubator wurden 100 µl der sogenannten Stopp-Lösung, bestehend aus 49,7 ml DMSO, 0,3 ml Salzsäure (HCL) und 5 g Natriumlaurylsulfat (*engl. sodium dodecyl sulfate (SDS)*), hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 min, diesmal bei RT, erfolgte dann die Messung der optischen Dichte bei 540 und 570 nm mittels TECAN infinite M200 Pro bei entferntem Deckel. Die gemessene optische Dichte wurde anschließend in Prozent umgerechnet, um die prozentuale Wachstumshemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle darzustellen.

2.4.2 CellTiter-Glo® für T- Zellen und Synoviozyten

Der *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) stellt eine gute alternative Methode zur Testung der Zellvitalität dar. In diesem Fall wird die metabolische Aktivität am Beispiel von Adenosintriphosphat (ATP) gemessen. Je mehr ATP von den Zellen hergestellt wird, desto höher ist ihre Vitalität, bzw. je mehr ATP vorhanden ist, desto mehr metabolisch aktive Zellen sind in der Probe enthalten. Das vorhandene ATP sorgt für eine messbare Lumineszenz, die im TECAN infinite M200 Pro gemessen werden kann. Um eine Lumineszenz detektieren zu können muss die Substanz Luziferin mit Hilfe eines Enzyms (*Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase*) zu Oxyluziferin rea-

gieren. Diese Reaktion wird durch Mg^{2+} und ATP katalysiert, was die Funktionsweise des *CellTiter-Glo*® erklärt. Hierbei ist die schlussendliche Intensität der Lumineszenz proportional zur Menge des vorhandenen ATP, welche wiederum proportional zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen ist. Auf diese Art und Weise kann, ähnlich wie beim *MTT*-Assay, die Toxizität von bestimmten Substanzen auf den Zellen getestet werden [88].

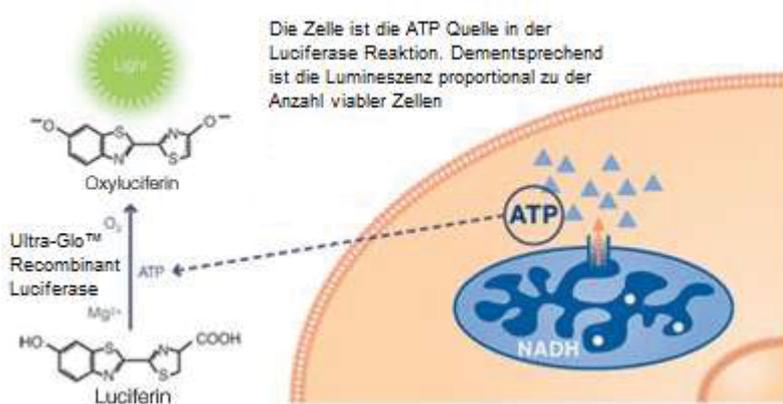


Abb. 8: Funktionsweise des CellTiter-Glo® anhand von ATP

Die Vitalität der Zelle wird anhand ihrer Umsetzung von ATP gemessen. Metabolisch aktive Zellen produzieren ATP, dieses wandelt das dazu gegebene Luciferin in OxyLuciferin um und die Lumineszenz kann gemessen werden. Quelle: modifiziert nach Promega

Im Lieferumfang waren *CellTiter-Glo*® *Substrate* und *CellTiter-Glo*® *Buffer* enthalten. Um mit dem Versuch zu starten, wurde im Vorfeld eine lichtundurchlässige 96-Lochplatte mit Zellen besät. Das Experiment wurde mit HFLS und mit T-Zellen durchgeführt. Die Stimulation der HFLS für diesen Assay war analog zu dem beschriebenen Vorgehen mit Keratinozyten (Kapitel 2.4.1). Jedoch wurde die Verdünnungsreihe in DMEM Medium angesetzt. Da es sich bei den T-Zellen bekanntermaßen um Suspensionszellen handelt, wich das Vorgehen hier etwas ab. 50 μ l T-Zellen in RPMI Medium wurden in jeden Ansatz der lichtundurchlässigen 96-Lochplatte vorgelegt. Anschließend kamen nur 50 μ l der Mischungen hinzu, um die Verdünnung der Substanzen durch die 50 μ l, die bereits in den Ansätzen vorlagen zu kompensieren, wurde die Verdünnungsreihe angepasst (siehe Tabelle 5).

Finale Konzentration	Tofa Verdünnung	RPMI Medium	DMSO Verdünnung	RPMI Medium
10 µM	4 µl	1996 µl	4 µl	1996 µl
5 µM	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl
1 µM	300 µl	1200 µl	300 µl	1200 µl
0,6 µM	360 µl	240 µl	360 µl	240 µl
0,5 µM	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl
0,1 µM	300 µl	1200 µl	300 µl	1200 µl
0,05 µM	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl
0,0 µM		1200 µl		1200 µl

Tabelle 5: CellTiter-Glo® -Verdünnungsreihe der T- Zellen

Hierbei ist die Verdünnung von Tofacitinib und DMSO dargestellt. Die erste Zeile zeigt jeweils die Ausgangskonzentration. Aus dem ersten Röhrchen wurde die jeweilige Menge in das zweite Röhrchen gegeben und auf- und abpipetiert. Das Vorgehen wurde mit den übrigen Röhrchen wiederholt. Die einzige Ausnahme stellte das 0,6 µM Röhrchen dar, dessen Zeile hier grau hinterlegt ist. Die Verdünnung erfolgte zwar in dieses Röhrchen aus dem 1 µM Röhrchen, allerdings diente es nicht als Ausgangslage der weiteren Verdünnung. Die jeweilige Menge für das 0,5 µM Röhrchen wurde dem 1 µM Röhrchen entnommen.

Zur Kontrolle wurden auch Ansätze nur mit Medium und mit verdünntem Triton (1 %), welches zytotoxisch wirkt, versetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurden zunächst die Reagenzien auf RT gebracht. Anschließend kamen 10 ml des *CellTiter-Glo® Buffer* in das Fläschchen mit *CellTiter-Glo® Substrate*, um *CellTiter-Glo® Reagent* herzustellen. Nachdem eine homogene Flüssigkeit entstanden war, konnten 100 µl der Mischung, unter Zuhilfenahme einer Multikanalpipette, in die Ansätze gegeben werden. Ein sofortiger Farbumschlag von rosa zu gelb zeigt die Wirksamkeit an. Nachdem die Platte für 10 min bei RT inkubiert, konnte schlussendlich die Lumineszenz mithilfe des TECAN infinite M200 Pro ausgelesen werden.

2.5 RNA-Isolation

Die Ribonukleinsäure (*engl.* RNA)-Isolation ist die erste Voraussetzung für die nachfolgende Genexpressionsanalyse und wurde mit allen Zelllysaten durchgeführt, die im Vorhinein in RLT- Puffer eingefroren wurden.

Die Durchführung geschah mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kits* (Qiagen). Im Kit enthalten waren 2 ml Sammelröhrchen, Zentrifugen Säulen mit integriertem Filter aus Silica Gel (*RNeasy Mini Spin Columns* (pink)), RLT-Puffer, der bereits zur Zellernte genutzt wurde, RW1-Puffer, RNase-freies Wasser und RPE-Puffer Konzentrat. Vor der Nutzung musste der RPE-Puffer zunächst mit 220 ml 96-100 %igem Ethanol verdünnt werden, um benutzt werden zu können. Vor Beginn des Experiments mussten die Zelllysate vorerst aufgetaut werden. Um eine Degradierung der RNA zu verhindern, wurden die Röhrchen dazu auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit konnten die erforderlichen Säulen beschriftet werden. Als erstes kamen 350 µl 70 %iges Ethanol zu den lysierten Zellen. Die Mischung wurde daraufhin sofort auf eine Säule gegeben, welche zuvor in ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt wurde. Die anschließende Zentrifugierung fand bei 10000 rpm statt und dauerte 15 Sekunden (sec). Alle Flüssigkeit, die den Filter passiert hatte, wurde verworfen und die Säulen wurden auf neue 2 ml Sammelröhrchen gesetzt. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 700 µl RW1-Puffer, woraufhin eine erneute Zentrifugierung bei gleicher Einstellung stattfand. Wieder kamen die Säulen auf neue Sammelröhrchen, damit ihnen 500 µl RPE-Puffer zugefügt werden konnte. Zentrifugiert wurde abermals mit gleicher Einstellung und das Umsetzen der Säulen auf neue Sammelröhrchen erfolgte erneut. Nochmals kamen 500 µl RPE-Puffer hinzu und die darauf folgende Zentrifugierung erfolgte nun für 2 min abermals bei 10000 rpm. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugierung, ohne die Säulen umzusetzen, diesmal für 1 min bei einer Umdrehung von 13200 rpm. Schlussendlich kamen die Säulen auf vorher vorbereitete 1,5 ml Eppendorf Röhrchen und es erfolgte eine Zugabe von 35 µl RNase-freies Wasser auf den Filter. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei RT fand die letzte Zentrifugierung statt. Sie dauerte 1 min bei 10000 rpm. Die Säulen konnten entsorgt werden und die isolierte RNA wurde direkt auf Eis gelegt, um einen Zerfall der empfindlichen Strukturen zu verhindern [89]. Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA wurde ein *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung ist für die nachfolgende cDNA-Synthese elementar. Zunächst, wurde 1,5 µl RNase-freies Wasser auf die untere Messvorrichtung pipettiert. Die Messung dieses Wasser stellt den Null-Wert dar. Im Anschluss konnte mit der Messung der RNA Proben begonnen werden. Hierbei wurden immer jeweils 1,5 µl RNA auf die

Messvorrichtung des *NanoDrop* pipettiert.. Dargestellt wurden Qualität sowie Quantität der RNA.

2.6 cDNA- Synthese

Die cDNA- Synthese entspricht einer reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Hierbei wird aus der einsträngigen RNA, die aus den Zelllysaten isoliert wurde, eine zweisträngige, komplementäre DNA (engl. *complementary DNA* (cDNA)) synthetisiert. Diese kann dann im weiteren Verlauf unter Zuhilfenahme der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qPCR) amplifiziert werden, um wie in diesem Fall die Genexpression der Ausgangszellen analysieren zu können.

Die Funktionsweise der cDNA Synthese ist in Abb. 9 dargestellt.

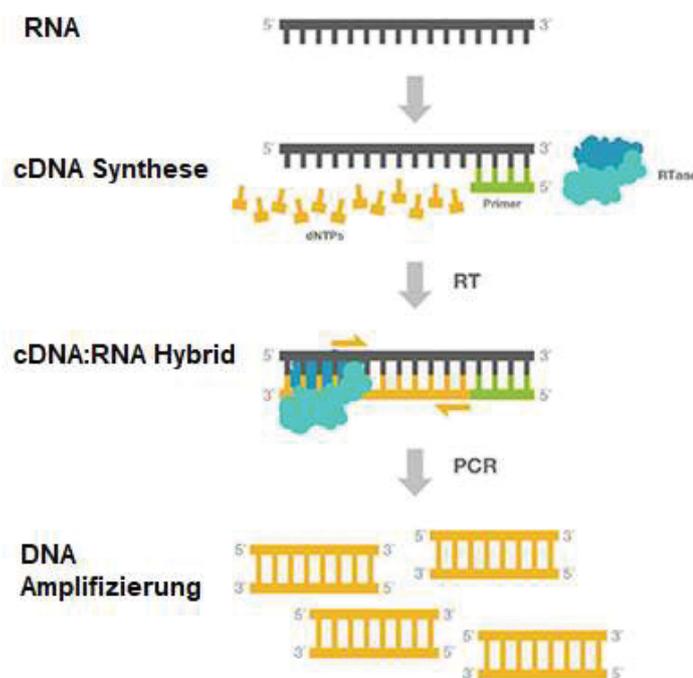


Abb. 9: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Aus der ursprünglich einsträngigen RNA entsteht mit Hilfe der RTase, angelagerten Primern und dNTP eine zweisträngige cDNA, die wiederum anhand der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qPCR) vervielfältigt werden kann. Abkürzungen: RTase= Reverse Transkriptase, dNTP = Desoxyribonucleosidtriphosphat. Quelle: modifiziert nach ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-applications.html>) Zugriff am 20.09.2019

Für die Durchführung der cDNA-Synthese wurde die zunächst 4 µg RNA mit in 0,5 ml Rörchen gegeben. Dies entsprach meist einem Gesamtvolumen von 10 µl RNA, konnte aber je nach Konzentration der RNA variieren. Falls weniger als 10 µl RNA nötig waren, wurde der Rest des Volumens mit sterilem Wasser aufgefüllt, sodass das eingesetzte Gesamtvolumen im 0,5 ml Rörchen immer 10 µl entsprach. Um das Verfahren in einem sogenannten ThermoCycler durchführen zu können, mussten nacheinander drei verschiedene Mixe auf die RNA pipettiert werden. Unter einem ThermoCycler versteht man ein Gerät, das die benötigten verschiedenen Temperaturzyklen einer PCR selbstständig durchführen kann. Die Mixe enthielten die Substanzen, wie z.B. Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), welche für die Umschreibung in cDNA notwendig waren. Angesetzt wurden sie in drei verschiedenen 1,5 ml Eppendorf Rörchen, die, um Verwechslungen zu vermeiden, eine Beschriftung erhielten.

	1x	16x	30x
First strand buffer 5x (invitrogen)	1,5 µl	24 µl	45 µl
Rnasin (Promega)	1 µl	16 µl	30 µl
Dnase Mix (Roche)	1 µl	16 µl	30 µl
steriles Wasser	2,5 µl	40 µl	75 µl

Tabelle 6: cDNA-Synthese Mix 1

Die Tabelle zeigt die Substanzen mit Hersteller, die für den Ansatz von Mix 1 gebraucht werden. Dargestellt sind jeweils die Mengen für eine variierende Probenanzahl. Die erste Spalte beschreibt die nötige Menge für eine RNA Probe. Beispielfhaft sind hier auch die Mengen für 16 Bzw. 30 Proben.

Von Mix 1 (siehe Tabelle 6) wurden 6 µl in jedes 0,5 ml Rörchen hinzugegeben. Die Rörchen wurden kurz zentrifugiert und anschließend in den ThermoCycler gestellt. Im Gerät erfolgte daraufhin eine Erwärmung der Proben erst für 20 min auf 37 °C und dann für 10 min auf 70 °C. Anschließend wurden sie auf 4 °C abgekühlt, um danach aus dem Gerät genommen zu werden. Schlussendlich konnten 4 µl von Mix 2 (siehe Tabelle 7) hinzugefügt werden.

	1x	16x	30x
Oligo dT (invitrogen) 16- 18	1 µl	16 µl	30 µl
Random Hexamer/ Primer (Promega)	0,4 µl	6,4 µl	12 µl
steriles Wasser	2,6 µl	41,6 µl	78 µl

Tabelle 7: cDNA-Synthese Mix 2

Die Tabelle zeigt die Substanzen mit Hersteller, die für den Ansatz von Mix 2 gebraucht werden. Dargestellt sind jeweils die Mengen für eine variierende Probenanzahl. Die erste Spalte beschreibt die nötige Menge für eine RNA Probe. Beispielfhaft sind hier auch die Mengen für 16 Bzw. 30 Proben.

Abermals erfolgte eine Zentrifugierung, bevor die Proben ins Gerät gesetzt werden konnten. In diesem Temperaturzyklus wurden die Röhren 10 min lang auf 70 °C erhitzt und schließlich auf 4 °C abgekühlt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10 µl des letzten Mixes (siehe Tabelle 8).

	1x	16x	30x
First strand buffer 5x (Invitrogen)	4,5 µl	72 µl	135 µl
dNTP (Bioline)	1,5 µl	24 µl	45 µl
DTT (Invitrogen)	1 µl	16 µl	30 µl
Rnasin (Promega)	0,5 µl	8 µl	15 µl
steriles Wasser	1,5 µl	24 µl	45 µl
SuperScript	1 µl	16 µl	30 µl

Tabelle 8: cDNA-Synthese Mix 3

Die Tabelle zeigt die Substanzen mit Hersteller, die für den Ansatz von Mix 3 gebraucht werden. Dargestellt sind jeweils die Mengen für eine variierende Probenanzahl. Die erste Spalte beschreibt die nötige Menge für eine RNA Probe. Beispielfhaft sind hier auch die Mengen für 16 bzw. 30 Proben.

Nach Zugabe von Mix 3 und einer erneuten Zentrifugierung wurden die Proben im ThermoCycler zuerst 50 min bei 42 °C und dann 10 min bei 70 °C erhitzt. Ein Abkühlen auf 4 °C war auch bei diesem Programm der letzte Schritt.

Als nächstes musste die fertig gestellte cDNA verdünnt werden. Je nach Qualität und Quantität der verwendeten Probe wurden hierfür entweder 370 µl steriles Wasser oder entsprechend weniger hinzupipettiert. Um für die nachfolgende Genexpressionsanalyse mittels qPCR einfacher verwendet werden zu können, kamen die Proben in eine 96-Loch *Masterplate*. Hierfür wurde eine Verdünnung von 1:4 angestrebt, was z.B. einer Menge von 40 µl cDNA und 120 µl sterilen Wassers entspricht. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cRNA-Proben erneut eingefroren und die *Masterplate* bei 4 °C, nach Verschluss durch einen NUNC Plattenaufkleber (ThermoScientific), im Kühlschrank aufbewahrt oder für längere Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) handelt es sich zunächst um eine einfache Nachahmung der Replikation, wie sie auch in der Zelle zur Vervielfältigung der Erbinformation angewendet wird. Der DNA-Doppelstrang wird geteilt bzw. denaturiert und ein komplementärer neuer Strang wird, nach vorheriger Anlagerung eines *Primers* an den Ausgangsstrang, mit Hilfe von DNA- Polymerasen und dNTPs angebaut. Hierbei besteht der Ablauf aus drei Schritten, die sich stets wiederholen. Dieser Prozess wiederholt sich, im Gegensatz zum zellulären Vorgehen, so lange, bis genügend DNA für eine Analyse vorhanden ist.

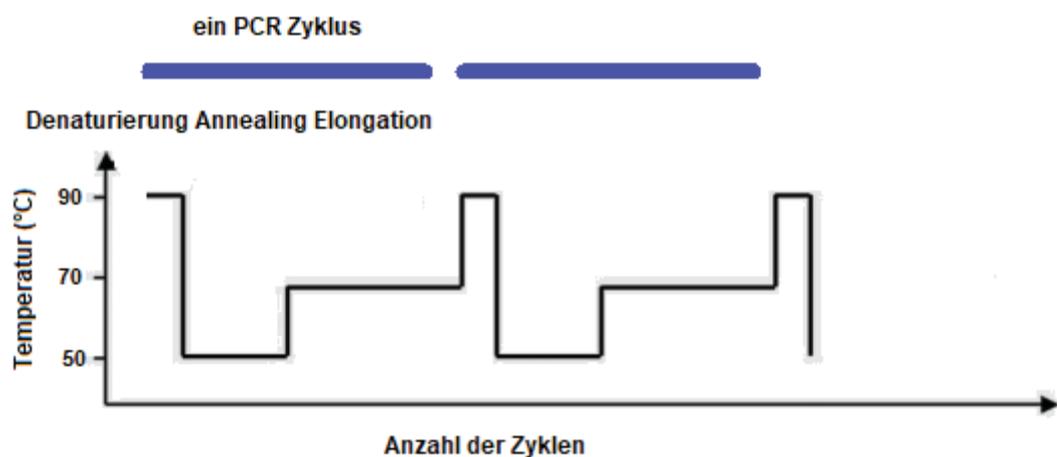


Abb. 10: Ablauf einer PCR mit schematischer Darstellung der drei Schritte

Dargestellt ist das Temperaturprofil der PCR in der jeweiligen Phase. Die X-Achse beschreibt die Temperatur in °C, wobei die Y-Achse die Anzahl der Zyklen anzeigt. Die erste Phase ist die Denaturierung, bei 90 °C, in der die DNA-Stränge getrennt werden. In der Anlagerungsphase (engl. *Annealing*) lagert sich der entsprechende Primer an den Einzelstrang an, dies geschieht am besten bei 55- 60 °C. Schließlich kann die Verlängerung des DNA-Stranges (engl. *Elongation*) vollzogen werden, dabei lagern die dNTPs an die DNA an und werden mit Hilfe der Taq-Polymerase verbunden. Dieser Zyklus wird ca. 30 bis 40- mal wiederholt. Quelle: eigene Darstellung

Auf diesem Prinzip baut die qPCR auf. Der Unterschied ist, dass mit Hilfe von fluoreszierenden Molekülen bereits nach einem Zyklus eine Quantifizierung stattfinden kann, also dementsprechend in Echtzeit ausgewertet wird. Für die Fluoreszenzdetektion gibt es verschiedene Möglichkeiten, die im Folgenden erläutert werden [90].

2.7.1 TaqMan™

Bei der *TaqMan*™-basierten qPCR werden *Primer* verwendet, die mit einem *Reporter*, der für die Fluoreszenz verantwortlich ist, und einem *Quencher*, der diese zunächst

hemmt, ausgestattet sind. Sobald die Taq- Polymerase an den *Primer* ansetzt, wird der *Reporter* freigesetzt und fluoresziert [90].

Der eingesetzte *TaqMan™ Master Mix* enthielt Puffer, dNTPs, passive Referenzfärbung, thermostabile DNA Polymerase und andere Komponenten. Zusätzlich wurde für das jeweils zu testende Gen ein passender *Primer* einmal in 5`- und einmal in 3`- Richtung benötigt, sowie eine für das Gen nötige sogenannte „Sonde“. Sonde und *Primer* mussten mit sterilem Wasser und *TaqMan™ Master Mix* vermischt werden, um den finalen Mix für das Gen zu erhalten. Das benötigte Volumen für diese Reaktion ist in Tabelle 9 dargestellt.

Substanz	Konzentration	1x	30x
Master Mix		12,5 µl	375 µl
Sonde	10 µM	0,75 µl	22,5 µl
5' Primer	45 µM	0,6 µl	18 µl
3' Primer	45 µM	0,6 µl	18 µl
steriles Wasser		0,55 µl	16,5 µl
Total		15 µl	450 µl

Tabelle 9: Finaler Mix für TaqMan™ basierte qPCR

Dargestellt sind die nötigen Substanzen unter Angabe der Konzentration sowie des benötigten Volumens einmal für eine Probe und beispielhaft für 30 Proben.

Nach Herstellung des finalen Mixes konnten immer jeweils 15 µl in eine spezielle optische 96-Lochplatte (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate*, Thermo Fisher Scientific) pipettiert werden. Hinzu kamen 10 µl der im Vorhinein hergestellten cDNA (Kapitel 2.6). Als Negativkontrolle erhielt ein Ansatz keine Befüllung mit cDNA, sondern mit 10 µl sterilem Wasser. Die 96-Lochplatte wurde anschließend verschlossen (*StarSeal Advanced Polyolefin Film*, STARLAB) und 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um sowohl cDNA als auch Primermix am Boden der Ansätze zu sammeln. Die qPCR wurde mit dem *QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™ ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Dieses wurde auf *relative standard curve* sowie *Taqman reagent* programmiert. Zudem wurde als *Reporter* der Farbstoff „FAM“ eingestellt und der *Quencher* ausgestellt („NONE“).

House Keeping Gene

Beim *house keeping gene*, hier 18S ribosomale RNA, handelt es sich um ein als Referenzgen genutztes Gen, was in fast allen Zellen in gleicher Menge produziert wird. Bei

der Auswertung der späteren Ergebnisse wurden alle anderen Gene bezüglich ihrer Expression immer in Relation zur Expression von 18s gesetzt.

Das Prinzip entspricht einer normalen *TaqMan*TM *qPCR*, wobei jedoch ein spezielles Set mit Sonde und *Primern* verwendet wird. Außerdem wurden hier andere Konzentrationen und entsprechend Volumen der Substanzen genutzt (siehe Tabelle 10)

Substanz	Konzentration	1x	30x
Master Mix		12,5 µl	375 µl
18s Sonde	10 µM	0,15 µl	4,5 µl
18s 5' Primer	10 µM	0,15 µl	4,5 µl
18s 3' Primer	10 µM	0,15 µl	4,5 µl
steriles Wasser		2,05 µl	61,5 µl
Total		15 µl	450 µl

Tabelle 10: Finaler Mix für 18s *TaqMan*TM basierte *qPCR*

Dargestellt sind die nötigen Substanzen unter Angabe der Konzentration sowie des benötigten Volumens zuerst für eine Probe und beispielhaft für 30 Proben.

Das weitere Verfahren war ansonsten analog zu der oben beschriebenen *TaqMan*TM *qPCR*, bis auf die Einstellungen im QuantStudio Programm. Hier musste als *Reporter* „VIC“ und als *Quencher* „TAMRA“ eingestellt werden.

Assay on Demand

Für die Analyse mancher Gene wurden kommerziell erwerbliche Primermixe, sogenannte *Assay on Demand* (AOD) von Thermo Fisher verwendet. Dabei handelt es sich um eine fertig zusammengestellte Mischung aus den für das Gen nötigen *Primern* und der notwendigen Sonde. Durch den AOD Mix entfällt das Mischen der *Primer* und der Sonde mit den anderen Substanzen, sodass nur noch der AOD Mix hinzugegeben werden muss. Auch hier wurde der *TaqMan*TM *Master Mix* verwendet (siehe Tabelle 11):

Substanz	1x	30x
Master Mix	10 µl	300 µl
AOD Mix	1 µl	30 µl
Total	11 µl	330 µl

Tabelle 11: Finaler Mix für AOD basierte *qPCR*

Dargestellt sind die nötigen Substanzen unter Angabe des benötigten Volumens, zuerst für eine Probe und beispielhaft für 30 Proben.

In diesem Fall wurden lediglich 11 µl des finalen Mixes pro Ansatz der PCR-Platte verteilt. Alle weiteren Schritte und Einstellungen wurden analog zu einer *TaqMan*TM basierten qPCR (Kapitel 2.7.1) durchgeführt.

2.7.2 SYBR Green

Bei der *SYBR Green* basierten qPCR wird ein fluoreszierender Farbstoff eingesetzt, der direkt an die DNA bzw. an die Lücke zwischen den beiden Strängen bindet. Je mehr Doppelstränge vorhanden sind, desto mehr Fluoreszenz kann detektiert werden. Die Fluoreszenz ändert sich, sobald die Stränge denaturieren, was bei einer Schmelzkurvenanalyse dargestellt wird [90].

Auch hier ähnelt das Vorgehen den bereits beschriebenen Versuchsabläufen. Es wurde allerdings im Gegensatz zur bisherigen Durchführung der *SYBR*TM *Green Master Mix* (Applied BiosystemsTM) verwendet. Die *Primer* mussten zuerst zu einem *Primer Mix* vermengt werden, bevor sie mit den anderen Substanzen in Kontakt kamen. Hierfür nutze man bei einer Ausgangskonzentration von 45 µM jeweils 20 µl beider *Primer* und fügte 410 µl steriles Wasser hinzu. Der *Primer Mix* wurde mit dem *SYBR*TM *Master Mix* gemischt, um schließlich mit der cDNA zusammen auf eine PCR-Platte pipettiert zu werden (siehe Tabelle 12).

Substanz	1x	30x
Master Mix	12,5 µl	375 µl
Primer Mix (2 µM)	2,5 µl	75 µl
Total	15 µl	450 µl

Tabelle 12: Finaler Mix für SYBRTM Green basierte qPCR

Dargestellt sind die nötigen Substanzen unter Angabe des benötigten Volumens zuerst für eine Probe und beispielhaft für 30 Proben.

Bei den Einstellungen im QuantStudio Programm, wurde als *Reporter* „SYBR“ ohne *Quencher* („NONE“) gewählt, ansonsten verlief der restliche Versuch wie oben beschrieben.

2.7.3 Primerpaare

Die verwendeten Primerpaare und Sequenzen (sofern bekannt) sind in Tabelle 13 dargestellt.

Taqman		
<i>hBD2</i>	Sonde	5' CCA GGT GTT TTT GGT GGT ATA GGC GAT CC 3'
	rev	5' GGC TCC ACT CTT AAG GCA GGT 3'
	fwd	5' CCT CTT CAT ATT CCT GAT GCC TCT 3'
18s		Katalognummer: 4308329, Thermo Fisher Scientific
AOD		
<i>LL37</i>		Hs 01011708
<i>GMCSF (CSF2)</i>		Hs 00171266_A1
<i>IL17A</i>		Hs 99999082_m1
<i>IL22</i>		Hs 00220924 m1
<i>IL26</i>		Hs 00218189 m1
SYBR		
<i>S100A7</i>	rev	5' TGT CCT TTT TCT CAA AGA CGT C 3'
	fwd	5' AGA CGT GAT GAC AAG ATT GAC 3'
<i>S100A8</i>	rev	5' CCC TGT AGA CGG CAT GGA AA 3'
	fwd	5' AGC TGT CTT TCA GAA GAC CTG G 3'
<i>S100A9</i>	rev	5' GCC CCA GCT TCA CAG AGT AT 3'
	fwd	5' TCG GCT TTG ACA GAG TGC AA 3'
<i>OASL</i>	rev	5' GCA ACG ATG TCC CAT CTG TA 3'
	fwd	5' TGT GTC AGA AAA CAG CTC AAA AA 3'
<i>OAS2</i>	rev	5' TTC CTG GTG TCT GCA TTG TC 3'
	fwd	5' CTG GCA AAA GAA GCA AAG GA 3'
<i>ISG15</i>	rev	5' CCA GCA TCT TCA CCG TCA G 3'
	fwd	5' GCG AAC TCA TCT TTG CCA GTA 3'
<i>MX1</i>	rev	5' TTC TTC CAG CTC CTT CTC TCT G 3'
	fwd	5' AGA GAA GGT GAG AAG CTG ATC C 3'
<i>IL29</i>	rev	5' CAG CTT GAG TGA CTC TTC CAA GGC G 3'
	fwd	5' TGG ACC GTG GTC CTG GTG ACT 3'
<i>IFNγ</i>	rev	5' GTT CCA TTA TCC GCT ACA TCT GAA 3'
	fwd	5' ACG TCT GCA TCG TTT TGG GTT 3'
<i>Tbet</i>	rev	5' TGG TCT ATT TTT AGC TGG GTG ATG TCT G 3'
	fwd	5' GGT GGT AAC ATG CCA GGG AAC AGG A 3'
<i>RORc</i>	rev	5' CGG AAG AAG CCC TTG CAC CCC 3'
	fwd	5' GAC AGC ACC GAG CCT CAC GG 3'
<i>GATA3</i>	rev	5' GGG GCC GGT TCT GTC CGT TC 3'
	fwd	5' CCG GTC CAG CAC AGA AGG CA 3'

Tabelle 13: Auflistung der Primersequenzen und AOD Nummern

Dargestellt sind die Primerpaare immer in 5' nach 3' Richtung. Bei AOD ist die entsprechende Nummer des Assays angegeben und bei Taqman zusätzlich die Probe. Abkürzungen: rev = reverse (rückwärts), fwd = forward (vorwärts).

2.8 Lymphozyten-Aktivierungstest

Der Lymphozyten-Aktivierungstest (LAT) wird verwendet um eine zellvermittelte spezifische Immunantwort *in vitro* zu detektieren. Dabei werden Immunzellen mit einem Antigen stimuliert um nach der Stimulationszeit die Änderung der Expression des Oberflächenproteins *Cluster of differentiation 69* (CD69) mithilfe von Durchflusszytometrie zu messen. Bei CD69 handelt es sich um ein integrales, homodimeres Oberflächenprotein mit einer transmembranen Domäne. Dieses Antigen ist auf allen aktivierten T- und B-Zellen sowie NK-Zellen zu finden, allerdings nicht auf unaktivierten Zellen des peripheren Blutes. Durch Aktivierung des T-Zell-Rezeptor (TCR)/CD3 Komplex, kann man eine rasche Zunahme der Expression an CD69 Antigen an der Zelloberfläche feststellen. Eine Aktivierung des Antigens ist aber auch auf andere Art und Weise möglich. CD69 gilt außerdem als Kostimulator für die T-Zelldifferenzierung und Proliferation [91-93]. Ziel dieser Experimente war es herauszufinden, ob Tofacitinib einen Einfluss auf die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen hat. Hierzu wurden zunächst PBMCs isoliert, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Die isolierten PBMCs wurden in 1 ml RPMI Medium, welches 5 % humanes AB Serum enthielt, resuspendiert, um sie zählen zu können. Die PBMCs wurden dann auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Fünf Ansätze wurden als Kontrolle für die spätere Durchflusszytometrie (engl. *Flow cytometry*) genutzt. In alle Ansätze wurden 200 μ l Zellsuspension pipettiert, sodass schlussendlich 1×10^6 Zellen pro Ansätze vorhanden war. Eine Lösung mit einer DMSO Konzentration von 100 μ M musste vorbereitet werden, indem 20 μ l DMSO mit 180 μ l PBS vermischt wurden. Nun kam das Medikament Tofacitinib und DMSO in der angesetzten Verdünnung in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen hinzu (siehe Tabelle 14). Daraufhin war ein Vortexen der Röhrchen notwendig. Die Proben kamen dann für 45 min bei 37 °C in den Inkubator bevor die restlichen Substanzen hinzukamen. Als positive Stimulationskontrolle wurde CD2/CD28 (BD FastImmune™) verwendet, was eine T-Zellaktivierung zur Folge hat. Alle Ansätze kamen anschließend für 20 h bei 37 °C in den Inkubator.

Substanz		Volumen Tofa
PBS (negativ)		
CD2/CD2R (positiv)	4 µl	
DMSO	4 µl	
		12 µl
		2 µl
CD2/CD2R	1 µl	
	1 µl	12 µl
	1 µl	2 µl
VZV gE	10 µg/ ml	
	10 µg/ ml	12 µl
LPS	100 ng/ ml	
	100 ng/ ml	12 µl
	100 ng/ ml	2 µl

Tabelle 14: Stimulanzen unter Angabe der Konzentration und des verwendeten Volumens

Dargestellt sind die verschiedenen Substanzen die für die Stimulation der PBMCs nötig waren. In der zweiten Spalte ist immer jeweils die Konzentration bzw. das Volumen der Substanz aus der ersten Spalte angegeben. Nach einer Inkubationszeit von 45 min mit DMSO und Tofacitinib (Konzentration Vorrat: 10 µM) kamen CD2/CD2R, sowie VzV gE und LPS in angegebener Menge hinzu.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die erste Zentrifugierung der Proben für 5 min bei RT bei 1500 rpm. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl Durchflusszytometrie-Puffer (im weiteren Verlauf Puffer genannt) resuspendiert, woraufhin 3 Tropfen eines 1:4 verdünnten humanen AB Serums hinzu kamen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. In der Zwischenzeit konnte der Antikörper-Mastermix vorbereitet werden. Zunächst erfolgte die Vorbereitung des Antikörpers zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen (Zombie NIR Life/Dead (LD), Biolegend) welches erst im Verhältnis von 1:50 mit PBS vermengt wurde. Der Mastermix musste in einem braunen Sammelröhrchen angesetzt werden und hatte ein finales Volumen von 900 µl, das sich wie folgt zusammen setzte: 765 µl Puffer, 45 µl vom verdünnten LD, 45 µl CD69- Antikörper (konjugiert an PE-Fluorochrom, Biolegend) und 45 µl CD3- Antikörper (konjugiert an APC-Fluorochrom, Biolegend). Nach der Inkubation der Proben mit Serum auf Eis wurde den Röhrchen 500 µl Puffer hinzugefügt, woraufhin eine erneute Zentrifugierung bei gleicher Einstellung wie zuvor erfolgte. Abermals konnte der Überstand abgenommen und schließlich in jedes Röhrchen 50 µl Antikörper Mastermix hinzugefügt werden. Die Durchflusszytometrie-Kontrollen mussten nun ebenfalls pipettiert werden, hierfür kamen Puffer und der entsprechende Antikörper in die vorbereiteten Sammelröhrchen (siehe Tabelle 15).

Kontrolle	Puffer	Antikörper
Ungefärbt	50 µl	nichts
CD3-APC	50 µl	2,5 µl CD3-APC
CD69-PE	50 µl	2,5 µl CD69-PE + 2,5 µl CD4-PE
LD-APC-Cy7	50 µl	2,5 µl CD3-APC-Cy7
Isotypen	50 µl	2,5 µl mIgG1-APC + 5 µl mIgG1-PE

Tabelle 15: Kontrollen für die Durchflusszytometrie

Dargestellt sind die jeweiligen Kontrollen unter Angabe des Volumens an Puffer und an Antikörper, der hinzugefügt wurde.

Alle Proben wurden im Anschluss gemischt und 30 min im Dunkeln auf Eis gelagert. Erneut kamen 500 µl Puffer dazu und eine wiederholte Zentrifugierung erfolgte analog zum bisherigen Protokoll. Wie auch zuvor wurde der Überstand entfernt, jedoch wurde nun das Pellet in 100 µl 4 %iger Paraformaldehyd (PFA) Lösung gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 15 min kam abermals 500 µl FACS Puffer hinzu und auch die Zentrifugierung erfolgte erneut. Zum letzten Mal musste der Überstand entfernt werden, damit die Zellen in 200 µl Puffer resuspendiert werden konnten. Die Proben waren nun bereit zur Analyse mit dem Durchflusszytometer CytoFlex S von Beckman Coulter.

2.8.1 Interferon Gamma Release Assay

Der *Interferon Gamma Release Assay* ((IGRA); *QuantiFERON-TB-Gold-Plus-Test* (QFT®-Plus, QIAGEN)) dient dem Nachweis einer latenten Tuberkulose. Es handelt sich um einen IFN- γ Freisetzungstest, der ausschließlich auf Mtb reagiert im Gegensatz zum früheren unspezifischen Tuberkulin-Hauttest. Allerdings ist auch der IGRA wie der Tuberkulin-Hauttest, ebenfalls nicht in der Lage zwischen latenter und akuter Infektion mit Mtb zu unterscheiden. Im Lieferumfang enthalten sind vier Antigenbeschichtete Sammelröhrchen (ESAT-6/ CFP-10/ TB-7.7). Bei den vier Röhrchen handelt es sich um eine Positivkontrolle (Mitogen), eine Negativkontrolle (Nil) und zwei Tbc-Teströhrchen (TB1 und TB2). Im TB1 Teströhrchen werden nur CD4+ TH-Zellen stimuliert, im TB2 Röhrchen noch zusätzlich CD8+ TH-Zellen [94, 95].

Für die Durchführung waren vorbereitende Schritte notwendig. Das verwendete Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose wurde vom Leber- und Infektionszentrum der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt und wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde zunächst in zwei neue Lithium-Heparin Röhrchen überführt, um sicherzustellen, dass sich in jedem Röhrchen 5 ml Blut befanden. Das erste Röhrchen blieb unverändert, während in das zweite 30 µl Tofacitinib in einer

Konzentration von 100 μM kamen (final: 600 nM). Es folgte eine Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C. Im Anschluss erfolgte die Verteilung von 1 ml Blut in jeweils ein QuantiFERON® Röhrchen und zwar so, dass am Ende vier Röhrchen (Mitogen, TB1, TB2 und Nil) mit dem Kontrollblut und vier weitere Röhrchen mit dem mit Medikament versetzten Blut befüllt waren. Alle Röhrchen mussten invertiert und schließlich für 24 h inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde mit 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Plasma konnte abgenommen und in einem 1,5 ml Sammelröhrchen aufbewahrt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasma Proben bei -20 °C gelagert.

Für die Durchführung des IFN- γ ELISA mussten zunächst alle Flüssigkeiten sowie Standards nach Herstellerprotokoll angesetzt werden. Es kamen zunächst 50 μl des *working strength conjugate* in alle Ansätze. Im Anschluss kamen entweder 50 μl des Standards oder des zu testenden Plasmas in die entsprechenden Ansätze. Der Platteninhalt wurde vorsichtig gemischt, mit einem Deckel bedeckt und schließlich für 2 h bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit konnte der Waschpuffer nach Protokoll vorbereitet werden. Nach Ablauf der Zeit musste der Inhalt der Platte entfernt werden um die Platte sechs-mal mit 400 μl Waschpuffer zu waschen. Danach konnten 100 μl *Enzyme Substrat Solution* hinzupipettiert und die Platte für 30 min bei RT inkubiert werden. Um die Reaktion zu stoppen, kamen 50 μl der *Enzyme Stopping Solution* dazu, bevor schließlich die Messung der optischen Dichte bei 450 nm mithilfe des TECAN infinite M200 Pro gemessen wurde.

2.9 Auswertung und Statistik

2.9.1 GraphPadPrism

Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des GraphPadPrism Programms.

2.9.2 Zellvitalitätsassay

Für die graphische Darstellung und Auswertung der Zellvitalitätsassays wurden die gemessenen Werte der Lumineszenz bzw. der optischen Dichte in Prozent umgerechnet. Hierfür diente die Mediumkontrolle als Referenzwert, der auf 100 % festgelegt wurde. Alle anderen Werte wurden zu diesen 100 % in Relation gesetzt.

2.9.3 qPCR

Die erhaltenen Werte der qPCR Durchläufe zeigten immer die Genexpression eines Genes unter einem bestimmten Stimulus an. Um beurteilen zu können, ob die Genexpression besonders hoch ist oder z.B. gehemmt wurde, mussten die Werte in Relation gesetzt werden. Hierfür wurde das konstitutiv exprimierte, nicht regulierte Gen 18s gewählt, dessen Expression immer mit getestet wurde. So ergab sich die graphische Darstellung der Ergebnisse in relativen Einheiten (RE), da alle Werte in Relation zu 18s gesetzt wurden.

2.9.4 Statistische Auswertung

Um herauszufinden, ob es sich um signifikante Ergebnisse handelt, wurden statistische Tests durchgeführt. Zunächst der D`Agostino Test durchgeführt werden, um festzustellen, ob es sich um eine gaußsche Normalverteilung handelt oder nicht. Da dieser Test erst ab einem Stichprobenumfang von 10 ($n=10$) und größer angewendet werden kann, wurde im weiteren Verlauf bei Stichproben kleiner als 10 davon ausgegangen, dass keine gaußsche Normalverteilung vorlag und somit nicht-parametrische statistische Tests durchgeführt. Einer dieser nicht-parametrischen Tests ist der Mann-Whitney-Test. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt dargestellt: p-Wert $\leq 0,05$ entspricht *, p-Wert $\leq 0,01$ entspricht ** und ein p-Wert $\leq 0,001$ entspricht ***.

3 Ergebnisse

3.1 Zellvitalitätsassays

Die Zellvitalität von T-Zellen, Keratinozyten und HFLS wurde unter Zugabe von Tofacitinib und DMSO getestet, um den Einfluss der Substanzen auf die Zellen zu charakterisieren und sicher zu stellen, dass sie den verschiedenen Zellen gegenüber keine toxischen Effekte aufweisen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Während die Vitalität der Keratinozyten mittels MTT-Assay kontrolliert wurde, wurde der *CellTiter-Glo*® für T-Zellen und HFLS verwendet.

Die Ergebnisse der durchgeführten Tests sind in Abb. 11 dargestellt. In Abb. 11A erkennt man die Ergebnisse des *MTT*-Assays mit Keratinozyten. Die unbehandelte Kontrolle, bestehend aus Keratinozyten und Medium, ergibt eine Vitalität von 100 %. Die Negativkontrolle, bestehend aus 5 %igem DMSO, liegt bei ca. 25 % Vitalität und stellt somit den Wert für die geringste optische Dichte dar. Bei Zugabe von 5 %igem DMSO sind die Zellen demnach in ihrer Vitalität stark eingeschränkt. Alle anderen Werte liegen deutlich darüber. Tofacitinib in einer Konzentration von 0,05 μM resultiert hier in einer Vitalität knapp unter 100 %. Bei DMSO 0,05 μM , also der Vergleichskonzentration, in der Tofacitinib gelöst wurde, ergibt dagegen eine Vitalität von 100 %. Alle anderen gemessenen Werte liegen über der unbehandelten Kontrolle und dementsprechend über 100 %.

Abb. 11B zeigt die Ergebnisse des *CellTiter-Glo*® für HFLS. Analog zu Abb. 11A stellt auch hier die unbehandelte Kontrolle 100 % Zellvitalität dar. Der Negativkontrolle wurde beim *CellTiter-Glo*® 1 %iges Triton zugesetzt. Diese zeigt hier einen Wert von <1 %, weshalb kein Balken zu erkennen ist. Vergleicht man 1 % Triton mit 5 % DMSO, lässt sich vermuten, dass 1% Triton deutlich toxischer wirkt als 5 % DMSO. Alle anderen Werte liegen auch hier über der Negativkontrolle und überragen zusätzlich die Mediumkontrolle.

Aus den Ergebnissen der Abb. 11C lässt sich der Effekt des Tofacitinib auf T-Zellen ableiten. Alle Parameter sind analog zu Abb. 11B. DMSO in einer Konzentration von 10 μM liegt knapp unter 100 % Vitalität und stellt somit den niedrigsten Wert dar. Tofacitinib 0,06 μM hat mit ca. 120 % die höchste Zellvitalität.

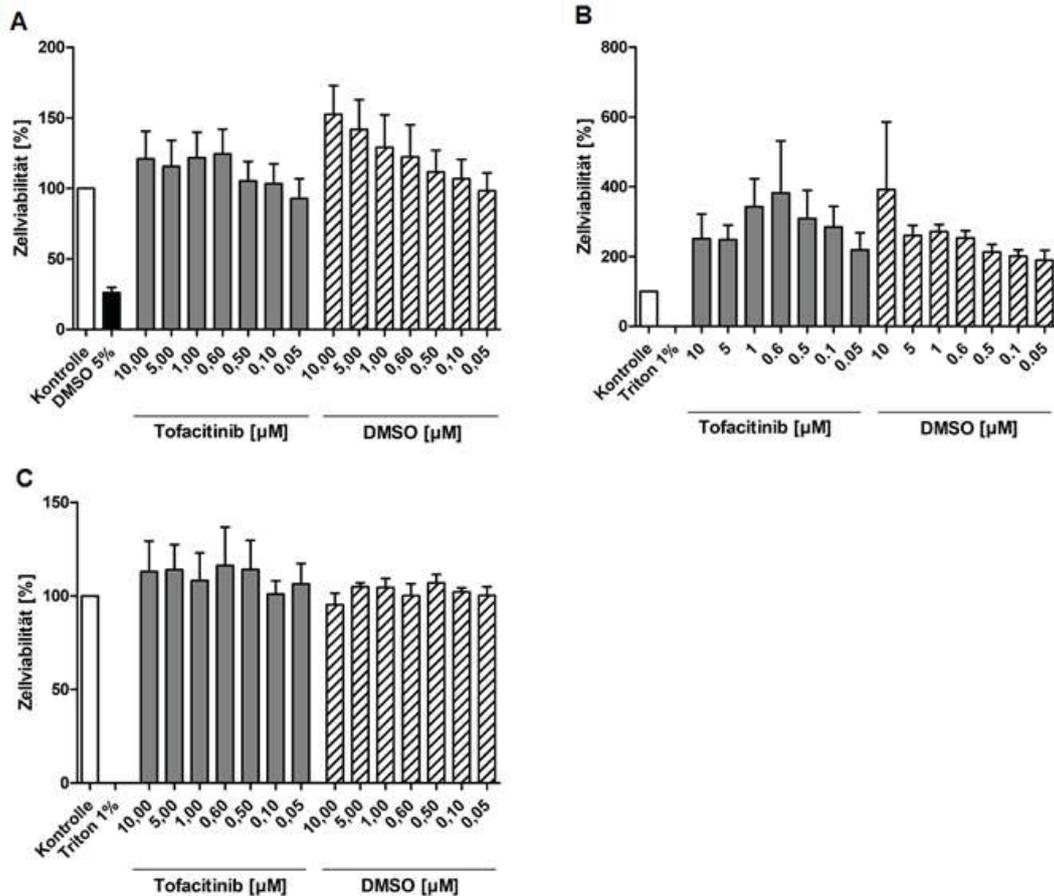


Abb. 11: Tofacitinib hat keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität

Um mögliche toxische Effekte zu evaluieren, wurden Keratinozyten (A, n=7), HFLS (B, n=5) und T-Zellen (C, n=3) 24 h lang mit Tofacitinib oder DMSO versetzt. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte Zellen mit entsprechendem Medium verwendet, die Negativkontrolle ist bei Keratinozyten (A) mit 5 % DMSO behandelt worden, bei HFLS (B) und T-Zellen (C) dagegen mit 1 % Triton. Anschließend konnte die Zellvitalität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Mtt)-Assay (A, Messung der optischen Dichte) oder CellTiter-Glo® (B und C, Messung der Lumineszenz) ermittelt werden. Auf der X-Achse ist jeweils Tofacitinib und DMSO in den jeweiligen Konzentrationen in μM dargestellt, während die Y-Achse die Zellvitalität in % zeigt. Die unbehandelten Zellen mussten zur Berechnung auf 100 % Vitalität gesetzt werden, um die Vitalität unter den einzelnen Bedingungen kalkulieren zu können. Dargestellt sind die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Medikament Tofacitinib genauso wie das Lösungsmittel DMSO in den verwendeten Konzentrationen keinen negativen Effekt auf die Zellvitalität der getesteten Zellen (Keratinozyten, Abb. 11A, HFLS, Abb. 11B und T-Zellen, Abb. 11C) hat.

3.2 Expressionanalysen antimikrobieller Peptide

Basierend auf der Hypothese, dass die Einnahme von Tofacitinib die Immunabwehr verändern könnte, wurden zunächst Keratinozyten mit Tofacitinib stimuliert und anschließend eine eventuelle Änderung der Genregulation von antimikrobiellen Peptiden untersucht. Die Testung der Genexpression der antimikrobiellen Peptide erfolgte nach Zugabe verschiedener bakterieller Antigene. Beispielhaft ist im Folgenden die Expression von Psoriasin (S100A7) in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulationsbedingungen gezeigt. Es handelt sich hierbei um qPCR-Ergebnisse, die relativ zu 18s gemessen wurden.

3.2.1 Expressionanalysen antimikrobieller Peptide in Keratinozyten

In Abb. 12 ist dargestellt, wie die alleinige Gabe von Tofacitinib in zwei verschiedenen Konzentrationen (Abb. 12A) und die kombinierte Gabe mit anschließender Zugabe von LPS (Abb. 12B) oder LTA (Abb. 12C) die Genexpression von S100A7 in Keratinozyten verändert. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass Tofacitinib keinen Effekt auf die Genexpression von LPS und LTA in Keratinozyten hat, da keine signifikante Änderung der Genexpression bei einer Stimulation mit LPS und zusätzlicher Gabe von Tofacitinib im Gegensatz zu einer alleinigen Stimulation der Zellen mit LPS zu erkennen ist (Abb. 12B). Gleiches gilt für die Untersuchungen mit LTA (Abb. 12C). Auch die alleinige Gabe von Tofacitinib (Abb. 12A) hat keine signifikante Änderung der Genexpression von S100A7 in Keratinozyten zur Folge.

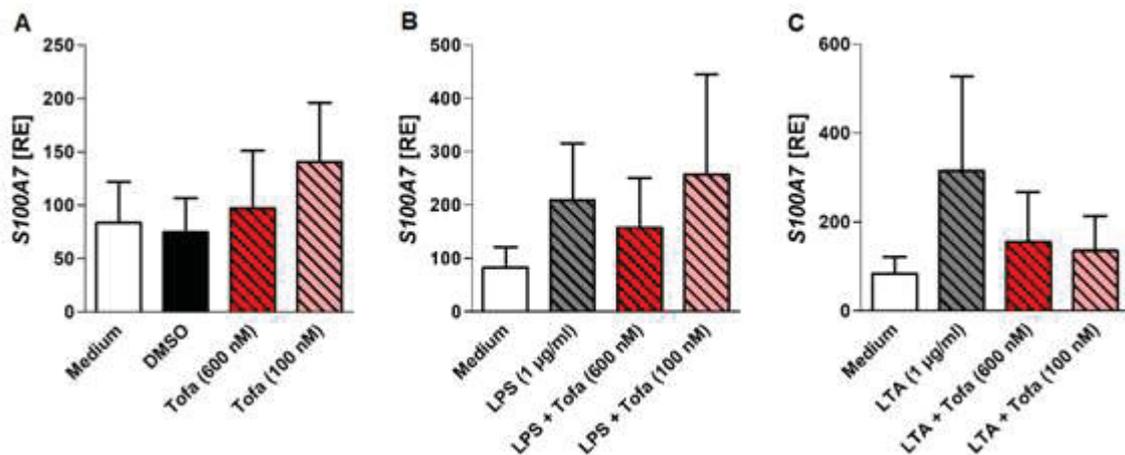


Abb. 12: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in Keratinozyten nach Stimulation mit LPS und LTA

Keratinozyten (n= 6) wurden erst 60 min lang mit Tofacitinib und DMSO (A), dann insgesamt 24 h lang mit den zusätzlichen Stimulanzen LPS (B) und LTA (C) versetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen mit Medium und als Negativkontrolle DMSO. Zusätzlich wurde Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM und 100 nM mit getestet. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzen aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression von Psoriasisin (S100A7) in relativen Einheiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s.

In Abb. 13 ist die Änderung der Genexpression von S100A7 unter Zugabe des von Mykobakterien sekretierten Peptidkomplexes aus ESAT-6 und CFP-10 sowie des mykobakteriellen Oberflächenmoleküls LAM Mtb dargestellt. Durch die alleinige Zugabe von ESAT-6 und CFP-10 erhöht sich die Expression des S100A7 in Keratinozyten leicht, jedoch aber nicht signifikant (Abb. 13A). Ein ähnlicher Effekt lässt sich bei Zugabe von LAM Mtb allein erkennen (Abb. 13B). Die Zugabe von Tofacitinib hat in Gegenwart von ESAT-6 und CFP-10 keine Auswirkung auf die Expression von S100A7 (Abb. 13A). Betrachtet man die S100A7 Expression bei kombinierter Stimulation mit Tofacitinib und LAM Mtb, lässt sich eine leichte Reduktion der S100A7 Expression messen. Jedoch auch unter Zugabe dieser bakteriellen Stimulanzen zeigt sich nach zusätzlicher Gabe von Tofacitinib keine signifikante Änderung der Genexpression.

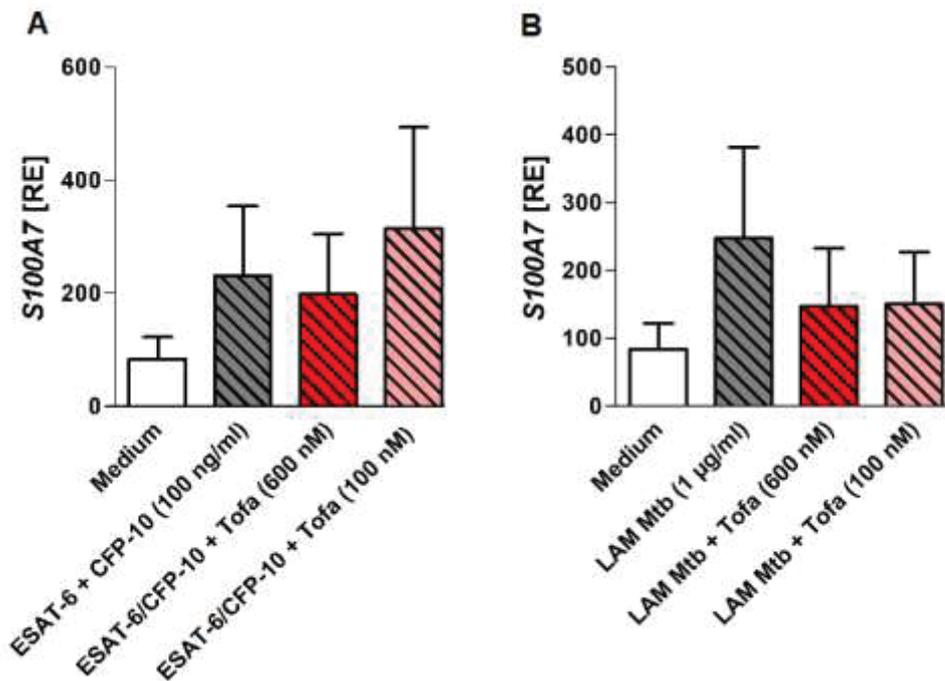


Abb. 13: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in Keratinozyten nach Stimulation mit ESAT-6 + CFP-10 und LAM Mtb

Analog zu Abb. 13 wurden Keratinozyten stimuliert. Diesmal kam zusätzlich zu Tofacitinib und DMSO ESAT-6 + CFP-10 (A) sowie LAM Mtb (B) hinzu, um die Genexpression von S100A7 unter diesen Gegebenheiten zu testen. Auch hier wurde die Genexpression mittels qPCR gemessen und ist ebenfalls als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s dargestellt.

In Abb. 14 ist die Genexpression von S100A7 unter Zugabe der von T-Zellen sekretierten Interleukine IL-17 und IL-22 mit und ohne Tofacitinib gezeigt. Dass beide Interleukine eine sehr starke Induktion von S100A7 zur Folge haben, lässt sich hier eindeutig feststellen. Im Vergleich zur Mediumkontrolle ist eine Signifikanz (p -Wert $\leq 0,01$) zu vermerken, was bedeutet, dass sowohl IL-17 (Abb. 14A) als auch IL-22 (Abb. 14B) in Keratinozyten das antimikrobielle Peptid Psoriasin induzieren. Bei zusätzlicher Zugabe von Tofacitinib ist jedoch insbesondere in Gegenwart von IL-17 keine signifikante Absenkung der Expression von S100A7 zu erkennen. In Abb. 14B hingegen lässt sich eine leichte Senkung der S100A7 Expression bei Gabe von IL-22 und Tofacitinib zeigen, dies ist jedoch nicht signifikant.

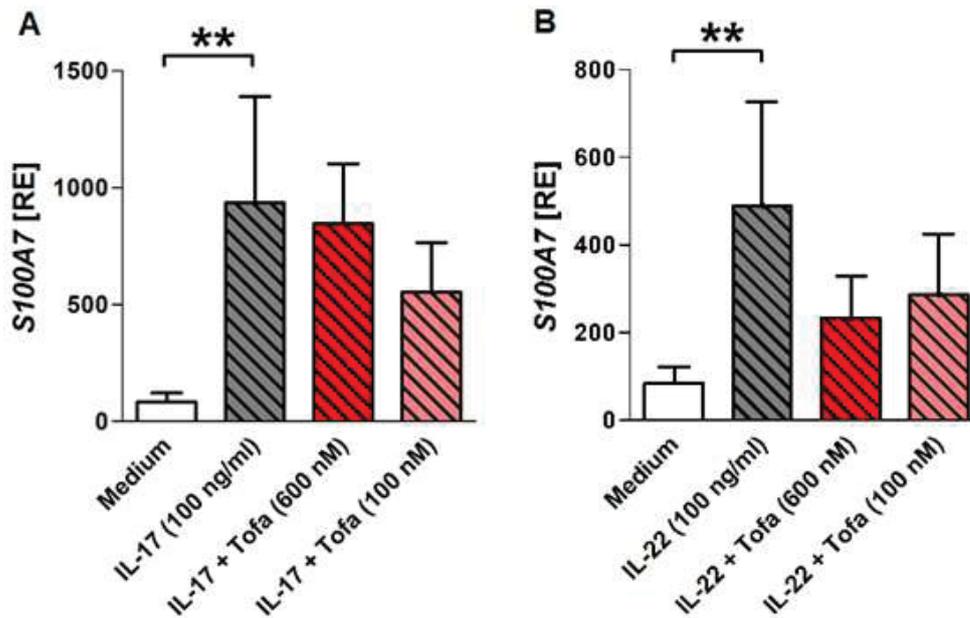


Abb. 14: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in Keratinozyten nach Stimulation mit IL-17 und IL-22

Analog zu Abb. 13 wurden Keratinozyten stimuliert. Diesmal kam zusätzlich zu Tofacitinib und DMSO IL-17 (A) und IL-22 (B) hinzu, um die Genexpression von S100A7 unter diesen Gegebenheiten zu testen. Auch hier wurde die Genexpression mittels qPCR gemessen und ist ebenfalls als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s dargestellt (** entspricht $P \leq 0,01$).

Zusätzlich zu S100A7 wurden auch andere Gene getestet und Keratinozyten mit weiteren Substanzen stimuliert, die in Tabelle 18 dargestellt sind. Die Stimulation der Keratinozyten mit IL-17 induziert erwartungsgemäß die Genexpression von allen getesteten antimikrobiellen Peptiden in einem signifikanten Ausmaß. Außerdem wurde eine signifikante Induktion von S100A8 und S100A9 in Gegenwart von IFN- γ gefunden.

Stimulanzen	Antimikrobielle Peptide			
	S100A8	S100A9	DEFB4	LL37
Tofa 600	ns	ns	ns	ns
Tofa 100	ns	ns	ns	ns
LPS	ns	ns	ns	ns
LTA	ns	ns	ns	ns
IL-17	***	**	**	*
IL-22	ns	ns	ns	ns
LAM Mtb	ns	ns	ns	ns
ESAT-6+ CFP-10	ns	ns	ns	ns
IFN gamma	**	**	ns	ns
IL-29	ns	ns	ns	ns

Tabelle 16: Genexpression antimikrobielle Peptide in Keratinozyten

Neben S100A7 wurden noch S100A8, S100A9, DEFB4 (HBD2) und LL37 getestet. Tabellarisch dargestellt ist, ob es jeweils eine signifikante Veränderung der Genexpression der einzelnen AMPs im Gegensatz zur Mediumkontrolle gibt. „ns“ steht hierbei für „nicht signifikant“. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt dargestellt: p-Wert $\leq 0,05$ entspricht *, p-Wert $\leq 0,01$ entspricht ** und ein p-Wert $\leq 0,001$ entspricht ***.

3.2.2 Expressionanalysen antimikrobieller Peptide in Synoviozyten

Auf gleiche Art und Weise wie bei den Keratinozyten wurden auch die HFLS stimuliert, um die Genexpression von S100A7 unter Zugabe von Tofacitinib zu testen.

Abb. 15 zeigt, analog zu den Keratinozyten, dass Tofacitinib allein keinen Effekt auf die Genexpression des S100A7 in HFLS hat (Abb. 15A). Generell sind die relativen Expressionen des S100A7 in HFLS deutlich geringer als in Keratinozyten (Vergleich Abb. 15 mit Abb. 12). Weder die alleinige Gabe von Tofacitinib bzw. DMSO (Abb. 15A), noch die kombinierte Stimulation mit LPS (Abb. 15B) oder LTA (Abb. 15C) zeigt eine signifikante Änderung der Expression von S100A7 im Vergleich zur Mediumkontrolle oder der einzelnen Stimulation mit LPS oder LTA. Der Nachweis einer signifikanten Änderung der Expression ist zudem durch die hohe Varianz in der Mediumkontrolle erschwert.

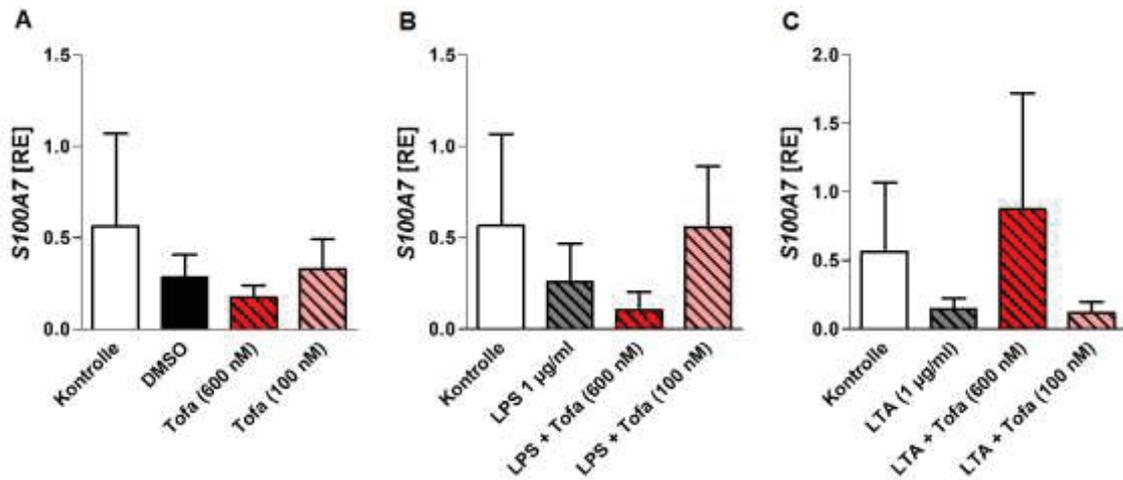


Abb. 15: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in HFLS nach Stimulation mit LPS und LTA

HFLS (n= 5) wurden erst 60 min lang mit Tofacitinib und DMSO (A), dann insgesamt 24 h lang mit den zusätzlichen Stimulanzen LPS (B) und LTA (C) versetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen mit Medium und als Negativkontrolle DMSO. Zusätzlich wurde Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM und 100 nM mit untersucht. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzen aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression von Psoriasisin (S100A7) in relativen Einheiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s.

Aus Abb. 16 lässt sich erneut ableiten, dass genau wie bei Keratinozyten, auch in HFLS kein Effekt auf die Genexpression von S100A7 durch Tofacitinib herbei zu führen ist. Weder die alleinige Stimulation der Zellen mit den bakteriellen Substanzen, noch die zusätzliche Gabe von Tofacitinib lässt einen signifikanten Effekt erkennen.

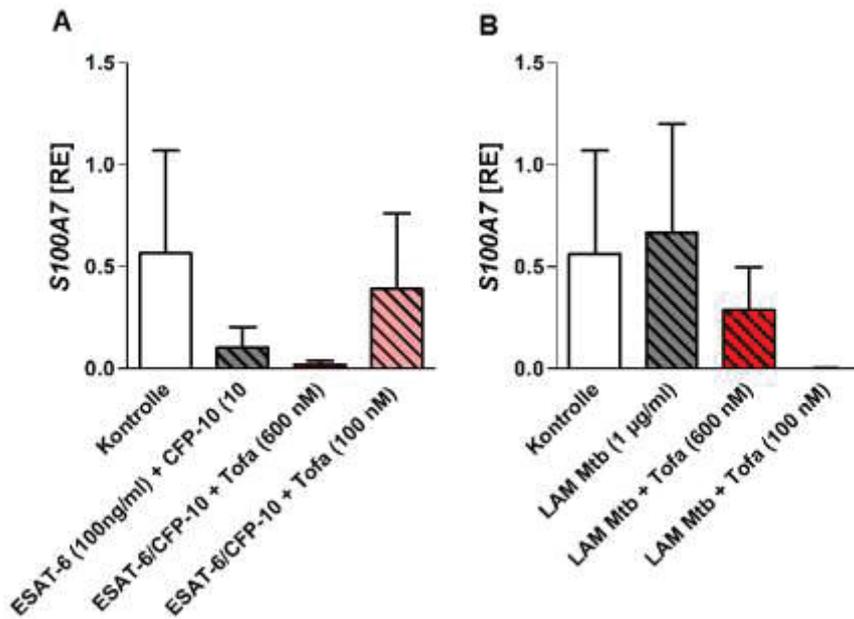


Abb. 16: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in HFLS nach Stimulation mit ESAT-6 + CFP-10 und LAM Mtb

Analog zu Abb.16 wurden HFLS stimuliert. Diesmal kam zusätzlich zu Tofacitinib und DMSO ESAT-6 + CFP-10 (A) sowie LAM Mtb (B) hinzu, um die Genexpression von S100A7 unter diesen Gegebenheiten zu testen. Auch hier wurde die Genexpression mittels qPCR gemessen und ist ebenfalls als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s dargestellt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Keratinozyten, zeigen HFLS in Abb. 17 keine signifikante Steigerung der Genexpression von S100A7 durch IL-17 oder IL-22. Zusätzlich dazu ist auch keine signifikante Absenkung der Expression durch den Zusatz von Tofacitinib zu erkennen.

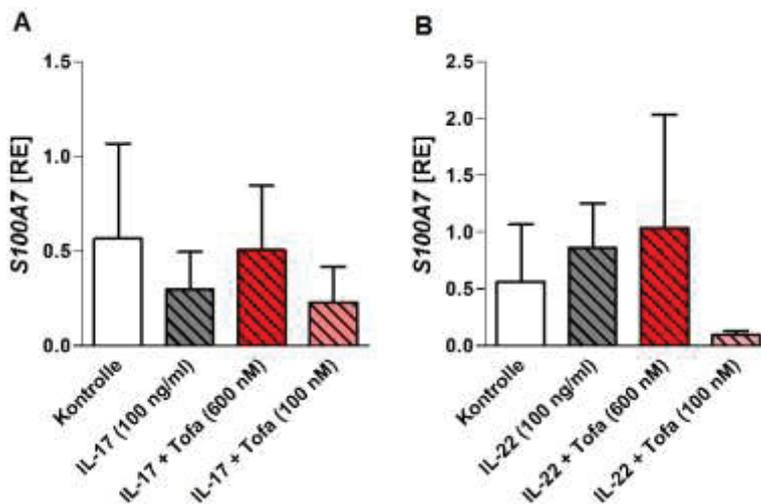


Abb. 17: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in HFLS nach Stimulation mit auf IL-17 und IL-22

Analog zu Abb. 16 wurden HFLS stimuliert. Diesmal kam zusätzlich zu Tofacitinib und DMSO IL-22 (B) und IL-17 (A) hinzu, um die Genexpression von S100A7 unter diesen Gegebenheiten zu testen. Auch hier wurde die Genexpression mittels qPCR gemessen und ist ebenfalls als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s dargestellt.

Auch bei den HFLS wurden zusätzlich zu S100A7 noch andere AMPs getestet. In Anbetracht der in Tabelle 17 zusammengefassten Ergebnisse scheinen die Synoviozyten wenig responsiv gegenüber bakteriellen Stimuli zu sein. Lediglich die Gabe von LPS löste eine signifikante Erhöhung der Expression von LL37 aus.

Stimulanzen	Antimikrobielle Peptide			
	S100A8	S100A9	DEFB4	LL37
Tofa 600	ns	ns	ns	ns
Tofa 100	ns	ns	ns	ns
LPS	ns	ns	ns	*
LTA	ns	ns	ns	ns
IL-17	ns	ns	ns	ns
IL-22	ns	ns	ns	ns
LAM Mtb	ns	ns	ns	ns
ESAT-6+ CFP-10	ns	ns	ns	ns
IFN gamma	ns	ns	ns	ns
IL-29	ns	ns	ns	ns

Tabelle 17: Genexpression antimikrobieller Peptide in HFLS

Neben S100A7 wurden noch S100A8, S100A9, DEFB4 (HBD2) und LL37 getestet. Tabellarisch dargestellt ist, ob es jeweils eine signifikante Veränderung der Genexpression der einzelnen AMPs im Gegensatz zur Mediumkontrolle gibt. „ns“ steht hierbei für „nicht signifikant“. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt dargestellt: p-Wert $\leq 0,05$ entspricht *, p-Wert $\leq 0,01$ entspricht ** und ein p-Wert $\leq 0,001$ entspricht ***.

3.3 Expressionanalysen antiviraler Peptide

Analog zur Testung der Gene der antimikrobiellen Peptide wurden auch die Gene der antiviralen Peptide auf ihre Expression unter Zusatz von Tofacitinib und diversen viralen Stimulanzen getestet. Beispielhaft ist hier im Folgenden die Expression von ISG15 in Abhängigkeit von verschiedenen Zusätzen gezeigt.

3.3.1 Expressionanalysen antiviraler Peptide in Keratinozyten

Zunächst wurden die Effekte von Tofacitinib auf die Genexpression von AVPs in Keratinozyten untersucht.

Abb. 18A zeigt zunächst den Effekt, den Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM auf die Keratinozyten hat. Es ist eindrücklich zu erkennen, dass 600 nM Tofacitinib die Expression des Gens ISG15 soweit hemmt, dass sich im Vergleich zur Mediumkontrolle eine Signifikanz von $P \leq 0,01$ ergibt. Auch 100 nM Tofacitinib senkt die Genexpression tendenziell, aber nicht signifikant ab. Abb. 18B zeigt erwartungsgemäß, dass eine Zugabe von IFN- γ eine deutliche Steigerung der ISG15-Expression zur Folge hat. Es liegt zwar keine signifikante Steigerung vor, allerdings gilt ein p-Wert von 0,07 als Trend zur Signifikanz. Diese Expression wird bei einer zusätzlichen Gabe von Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM signifikant gehemmt und entspricht fast der Expression in der Mediumkontrolle. Entsprechend hemmt 600 nM Tofacitinib die IFN- γ -induzierte ISG15-Expression zu nahezu 100 %. In Abb. 18C lassen sich die Auswirkungen von Tofacitinib in Gegenwart von IL-29 beurteilen. Mit einer Signifikanz von $P \leq 0,001$ im Gegensatz zur unbehandelten Mediumkontrolle ist eindrucksvoll veranschaulicht, wie stark IL-29 die Expression von ISG15 in Keratinozyten stimuliert. Die Hemmung der Effekte des IL-29 auf ISG15 mit Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM ist zwar nicht signifikant, es lässt sich jedoch ein Trend erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Tofacitinib einen Effekt auf die Stimulation des AVP ISG15 hat.

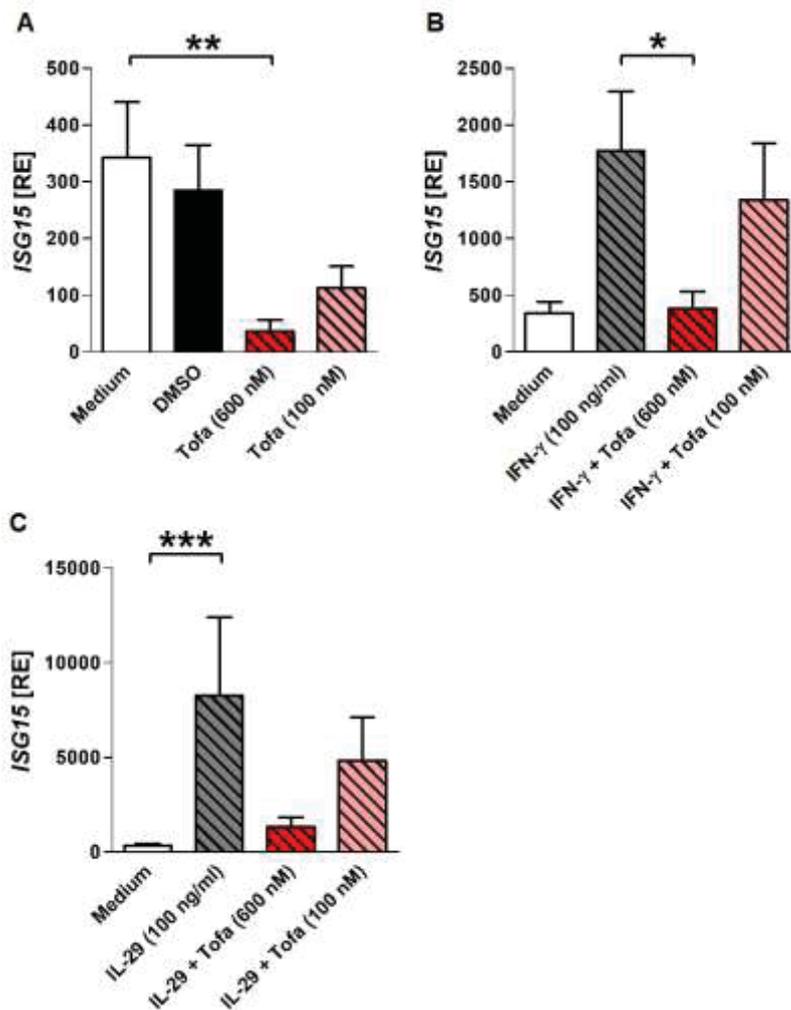


Abb. 18: Tofacitinib inhibiert die Expression von ISG15 in Keratinozyten nach Stimulation mit IFN- γ und IL-29

Keratinozyten ($n=6$) wurden erst 60 min lang mit Tofacitinib und DMSO (A), dann insgesamt 24 h lang mit den zusätzlichen Stimulanzen IFN- γ (B) und IL-29 (C) versetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen mit Medium und als Negativkontrolle DMSO. Zusätzlich wurde Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM und 100 nM mit getestet. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzen aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression von ISG15 in relativen Einheiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18S (* entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$).

Anschließend wurden Keratinozyten mit Varizella zoster Virus Impfstoff (VZV vaccine) sowie mit zwei unterschiedlichen Peptiden des Virus (VZV gE und VZV IE63) inkubiert. Abb. 19 zeigt, wie Keratinozyten auf verschiedenen Stimulanzen des VZV reagieren. In Abb. 19A sind abermals die Kontrollen dargestellt, wobei ersichtlich ist, dass die Sekretion von ISG15 in Keratinozyten wie gehabt durch Tofacitinib herabgesetzt wird. In Abb. 19B dagegen ist keine Steigerung der Expression nach Zugabe des VZV Impfstoffs zu erkennen. Dementsprechend kann auch kein hemmender Effekt durch Tofacitinib ausgelöst werden. Gleiches gilt auch für Abb. 19C und D. Hier wird zum einen dargestellt, wie die Zellen auf eine Zugabe von VZV gE (C) reagieren und zum

anderen, was eine Zugabe von VZV IE 63 zur Folge hat. Die Ergebnisse zeigen, dass hier, wie schon beim VZV Impfstoff, keine Steigerung der Expression von ISG15 resultiert und so auch keine signifikante Hemmung der Wirkung durch Tofacitinib zu vermerken ist.

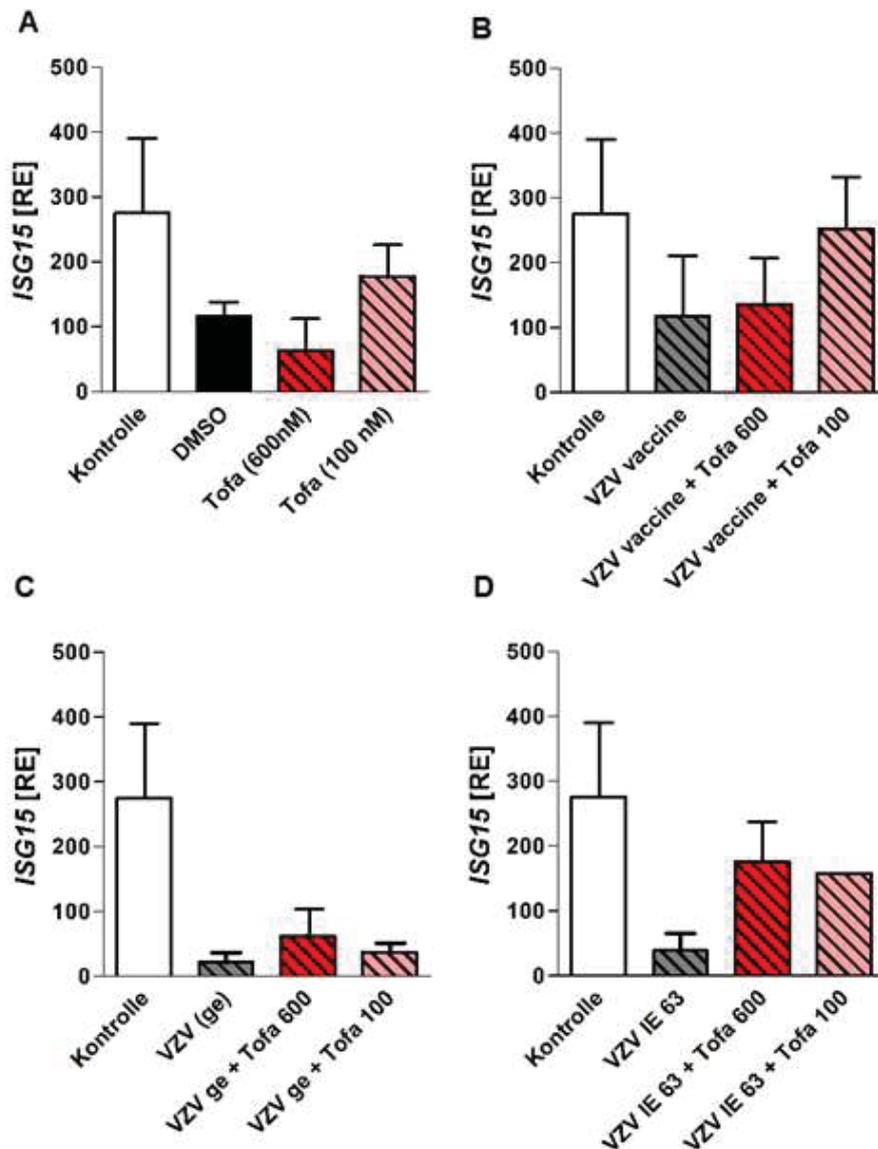


Abb. 19: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression des ISG15 in Keratinozyten nach Stimulation mit Varizella assoziierten Antigenen

Keratinozyten (n= 4) wurden erst 60 min lang mit Tofacitinib und DMSO (A), dann insgesamt 24 h lang mit den zusätzlichen Stimulanzen VZV vaccine (B), VZV gE (C) und VZV IE 63 (D) versetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen mit Medium und als Negativkontrolle DMSO. Zusätzlich wurde Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM und 100 nM mit getestet. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzen aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression von ISG15 in relativen Einheiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s.

Neben ISG15 sind zusätzlich auch andere AVPs getestet worden. Die Ergebnisse ähneln den Erkenntnissen, die die grafischen Darstellungen mit ISG15 zeigen und sind in Tabelle 18 dargestellt. Tofacitinib hemmt die Grundexpression von MX1, OASL und insbesondere OAS2 signifikant.

Stimulanzen	Antivirale Peptide			
	MX1	OASL	OAS2	IL29
Tofa 600	*	*	***	ns
Tofa 100	ns	ns	ns	ns
LPS	ns	ns	ns	ns
LTA	ns	ns	ns	ns
IL-17	ns	ns	ns	ns
IL-22	ns	ns	ns	ns
LAM Mtb	ns	ns	ns	ns
ESAT-6+ CFP-10	ns	ns	ns	ns
IFN gamma	*	**	ns	*
IL-29	*	***	ns	ns

Tabelle 18: Genexpression antiviraler Peptide in Keratinozyten

Neben ISG15 wurden ebenfalls MX1, OAS2, OASL und IL-29 getestet. Es wurde überprüft, ob es Unterschiede in der Genexpression des jeweiligen Gens unter Zugabe der einzelnen Stimulanzen im Gegensatz zur Mediumkontrolle gibt. „ns“ bedeutet hierbei „nicht signifikant“ (* entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$).

Im Gegensatz zu den antimikrobiellen Genen, lassen sich bezüglich der antiviralen Abwehr deutliche Effekte des Medikaments Tofacitinib auf die Genexpression in Keratinozyten beobachten.

3.3.2 Expressionsanalysen antiviraler Peptide in Synoviozyten

Nach den Keratinozyten wurden nun HFLS auf ihre Genexpression von antiviralen Peptiden in Gegenwart von Tofacitinib untersucht. Die Expression von ISG15 unter Zugabe von Tofacitinib ist in Abb. 20 dargestellt. Abb. 20A zeigt, dass Tofacitinib allein keinen Effekt auf die Grundexpression des ISG15 hat, während Abb. 20B einen deutlichen Anstieg der Genexpression durch IFN- γ erkennen lässt. Im Vergleich zur Mediumkontrolle lässt sich dieser Anstieg mit einer Signifikanz von $P \leq 0.01$ (dargestellt mit zwei Sternen) bewerten. Eine zusätzliche Gabe von Tofacitinib hemmt die Expression nicht signifikant, kann sie aber dennoch deutlich reduzieren. Abb. 20C zeigt schließlich eine signifikante Induktion von ISG15 durch IL-29, welche im Vergleich zur Mediumkontrolle ein Signifikanzniveau von $P \leq 0.01$ aufweist. Hier ist allerdings auch eine signifikante Hemmung durch Tofacitinib, sowohl in einer Konzentration von

600 nM, als auch in einer Konzentration von 100 nM, im Gegensatz zur Kontrolle zu erkennen.

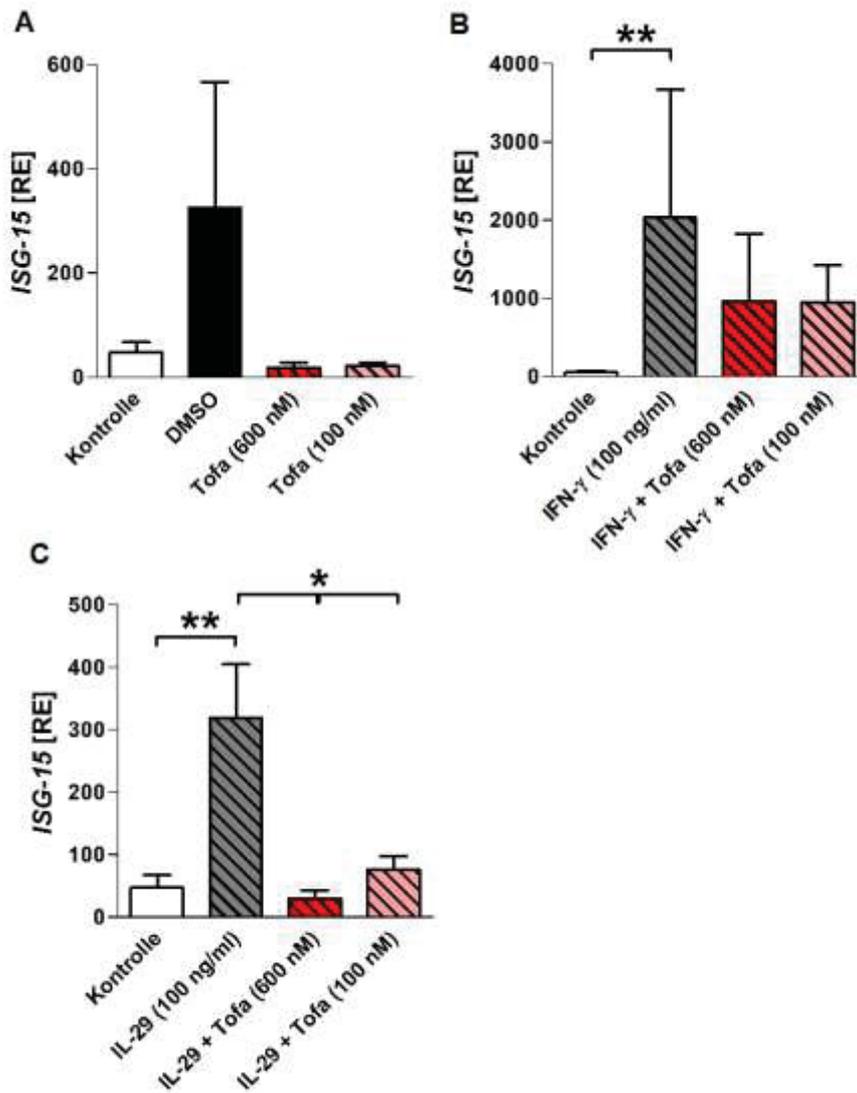


Abb. 20: Tofacitinib inhibiert die IFN- γ und IL-29 abhängige Expression von ISG-15 in HFLS

HFLS (n= 5) wurden zunächst 60 min lang mit Tofacitinib und DMSO (A), dann insgesamt 24 h lang mit den zusätzlichen Stimulanzen IFN- γ (B) und IL-29 (C) versetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen mit Medium und als Negativkontrolle DMSO. Zusätzlich wurde Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM und 100 nM mit getestet. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzen aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression von ISG15 in relativen Einheiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s (* entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$).

Wie zuvor wurden auch hier zusätzlich andere AVPs getestet, welche in Tabelle 19 dargestellt sind.

Stimulanzen	Antivirale Peptide			
	MX1	OASL	OAS2	IL29
Tofa 600	ns	ns	ns	ns
Tofa 100	ns	ns	ns	ns
LPS	***	ns	***	ns
LTA	ns	ns	ns	ns
IL-17	ns	ns	ns	ns
IL-22	ns	ns	ns	ns
LAM Mtb	ns	ns	ns	ns
ESAT-6+ CFP-10	ns	ns	ns	ns
IFN gamma	**	ns	***	ns
IL-29	**	ns	***	ns

Tabelle 19: Genexpression antiviraler Peptide in HFLS

Neben ISG15 wurden ebenfalls MX1, OAS2, OASL und IL-29 getestet. Es wurde überprüft, ob es Unterschiede in der Genexpression des jeweiligen Gens unter Zugabe der einzelnen Stimulanzen im Gegensatz zur Mediumkontrolle gibt. „ns“ bedeutet hierbei „nicht signifikant“ (** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$).

Ähnlich wie bei den Keratinozyten lassen sich auch bei den HFLS hemmende Effekte des Medikaments Tofacitinib in Bezug auf die Expression von ISG15 ausmachen. Die Grundexpressionen von den getesteten antiviralen Peptiden werden in HFLS durch Gegenwart von Tofacitinib nicht beeinflusst.

3.4 Einfluss des Tofacitinibs auf die T-Zell-Differenzierung, Aktivierung und Interaktion mit strukturellen Zellen

3.4.1 T-Zell-Differenzierung unter Tofacitinib

Wie in Kapitel 2.3.3, 2.5, 2.6 und 2.7 beschrieben, wurden T-Zellen hinsichtlich ihrer Genexpression unter Zugabe von Tofacitinib analysiert. So sollte die Rolle der JAK-Inhibition auf die T-Zell Differenzierung beleuchtet werden. Genauer gesagt sollte gezeigt werden, ob die TH17-Zell Differenzierung in Anwesenheit von Tofacitinib zu einem klassischen oder pathogenen Phänotyp führt.

Naive CD4⁺ T-Zellen wurden mithilfe von IL-6, IL-23, TGF- β , anti-IL-4 und anti-IFN- γ in TH17-Richtung polarisiert. Dies fand in Gegenwart oder Abwesenheit von Tofacitinib statt, um dessen Effekte auf die Differenzierung zu untersuchen. Die Genexpression sowie die Proteine wurden an Tag sieben der Zellkultur analysiert. Abb. 21A zeigt die Genexpression von IFN- γ , die nur durch eine Zugabe von 100 nM Tofacitinib ansteigt. Abb. 21B zeigt die Ergebnisse für IL-26. Hier lässt sich eine leichte Steigerung der Expression ablesen, es zeigt sich aber keine Signifikanz. Abb. 21C stellt die Expression von IL-22 dar, wobei durch Tofacitinib keine Änderung der Expression zu beobachten ist. In Abb. 21D ist die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 dargestellt. Diese Ergebnisse dienen zur Kontrolle, da GATA3 ein Transkriptionsfaktor für TH2-Zellen ist. Es zeigt sich wie erwartet kein Effekt durch Tofacitinib. Mit Tbet ist in Abb. 21E ein Transkriptionsfaktor dargestellt, der für pathogene TH17-Zellen charakteristisch ist. Es zeigt sich nur eine leichte Steigerung der Expression durch Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM. Es zeigte sich, dass Tofacitinib in beiden getesteten Konzentrationen (600 nM und 100 nM) RORc, einen Transkriptionsfaktor für klassische TH17-Zellen, leicht hochreguliert (Abb. 22F).

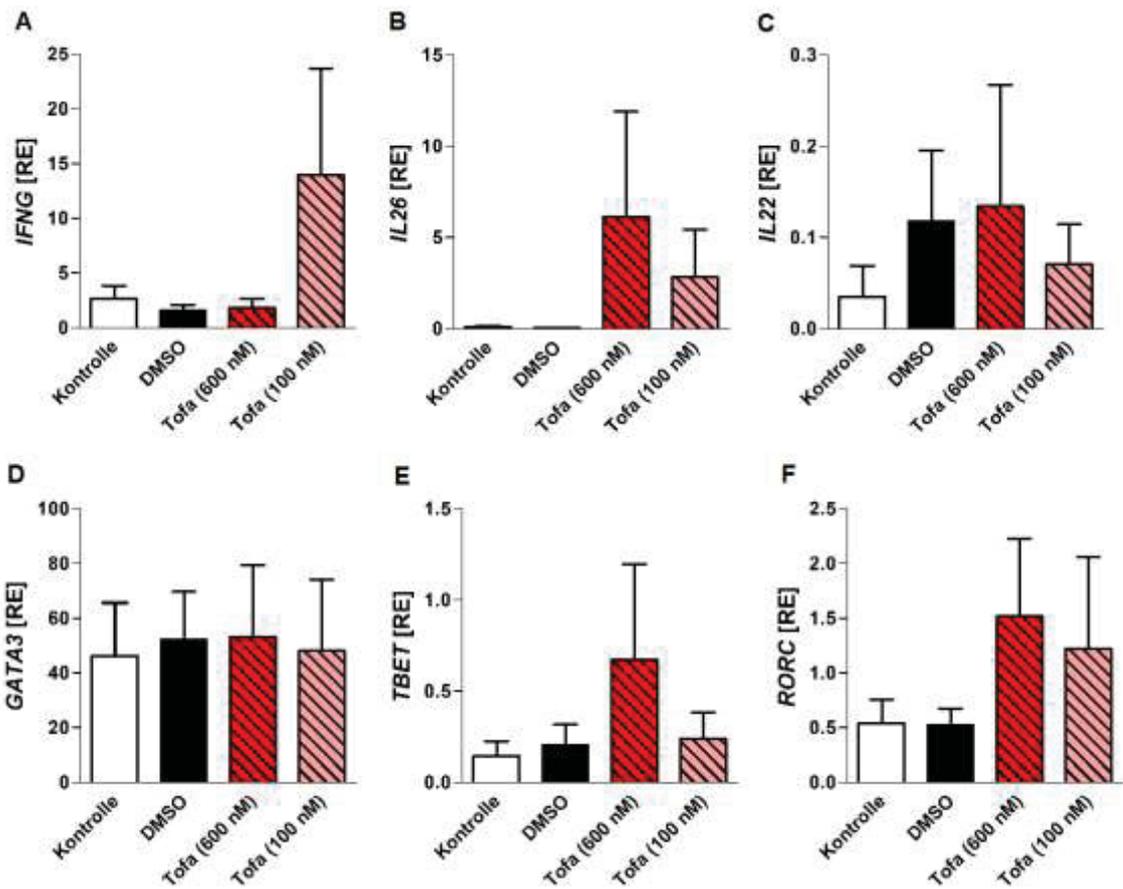


Abb. 21: Tofacitinib zeigt geringe Effekte auf die Genexpression in T-Zellen

Naive CD4⁺ T-Zellen (n= 7) wurden mit DMSO und Tofacitinib behandelt, um die Genexpression verschiedener Substanzen zu testen. Hierfür wurden die Zytokine IFN- γ (A), IL-26 (B) und IL-22 (C), sowie die Transkriptionsfaktoren GATA3 (D), Tbet (E) und RORc (F) bewertet. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzen aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression in relativen Einheiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s.

Abb. 22 zeigt die Ergebnisse der Proteinexpression. Abb. 22A zeigt einen Trend zur Hochregulation von IL-17 in CD4⁺ T-Zellen. Die Resultate für IL-26⁺ CD4⁺ T-Zellen in Abb. 22B sind gegenteilig. Hier liegt ein signifikantes Ergebnis vor, welches besagt, dass die Zugabe von Tofacitinib in beiden Konzentrationen die Entstehung IL-26⁺ CD4⁺ T-Zellen deutlich hemmt.

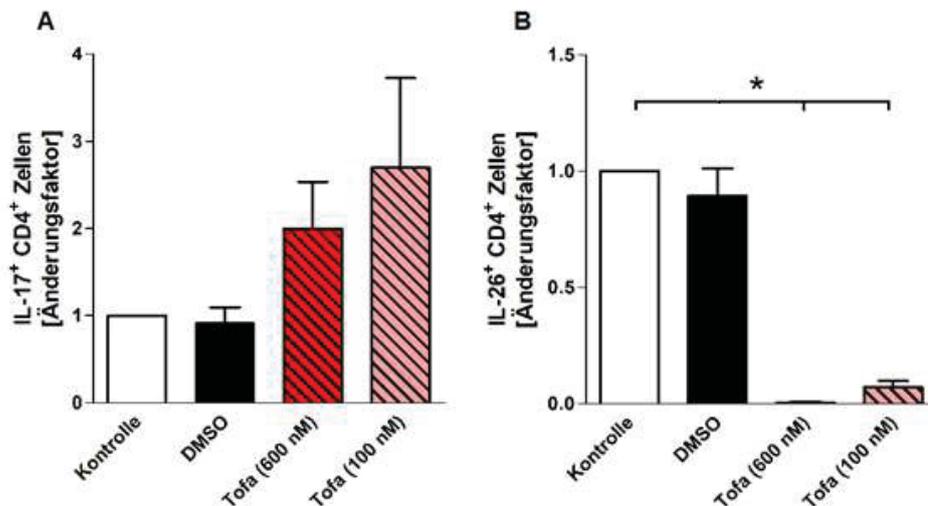


Abb. 22: Tofacitinib erhöht den Anteil von IL-17⁺ und reduziert den Anteil IL-26⁺ CD4⁺ T-Zellen

Im Rahmen der Durchflusszytometrie wurde analysiert, inwiefern Tofacitinib (600 nM bzw. 100 nM) den Anteil der IL-17⁺ (A) bzw. IL-26⁺ CD4⁺ T-Zellen (B) beeinflusst. Hierfür wurden naive T-Zellen in Richtung TH17-Zellen polarisiert (n=9) und mit Tofacitinib stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie als *fold change* ausgewertet (* entspricht $P \leq 0,05$).

3.4.2 Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen unter Tofacitinib

Da auch eine verminderte Zellaktivierung zu einer erhöhten Infektionsrate führen könnte, wurde die Auswirkung von Tofacitinib auf die Aktivierung von Lymphozyten, hier CD3⁺ T-Zellen, anhand des Oberflächenmoleküls CD69 untersucht. Abb. 23 zeigt die Ergebnisse des Lymphozytenaktivierungstest (LAT) nach der entsprechenden Durchflusszytometrie-Auswertung. Abb. 23A zeigt zunächst die Kontrollen an. Es ist zu erkennen, dass in der unbehandelten Kontrolle nur ein sehr geringer Prozentsatz (ca. 2%) der PBMCs zu den aktivierten CD69⁺ CD3⁺ T-Zellen zählen. Gleiches gilt unter Zugabe von DMSO und Tofacitinib in beiden Konzentrationen. Die Positivkontrolle α -CD2/CD2R führt zu einer Aktivierung von 30 % der Zellen. Zudem liegt eine signifikante Hemmung durch Tofacitinib in einer Konzentration von 0,6 μ M im Vergleich vor (Abb. 23B). Abb. 23C zeigt die Effekte des LPS auf selbige Zellen. Ähnlich wie CD2/CD2R induziert auch LPS eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der CD69⁺ CD3⁺ T-Zellen. Auch hier wirkt Tofacitinib (0,6 μ M) zu einer signifikanten Aktivierungshemmung. Da in klinischen Studien ein erhöhtes Auftreten von Zoster-Infektionen unter Tofacitinib zu beobachten war, lag unser größtes Augenmerk auf der T-Zell-Stimulation mit VZV-Antigenen (VZV gE). Auch hier zeigt sich eine signifikante Inhibition der VZV gE-induzierten Aktivierung (Abb. 23D, Darstellung als Änderungsfaktor)

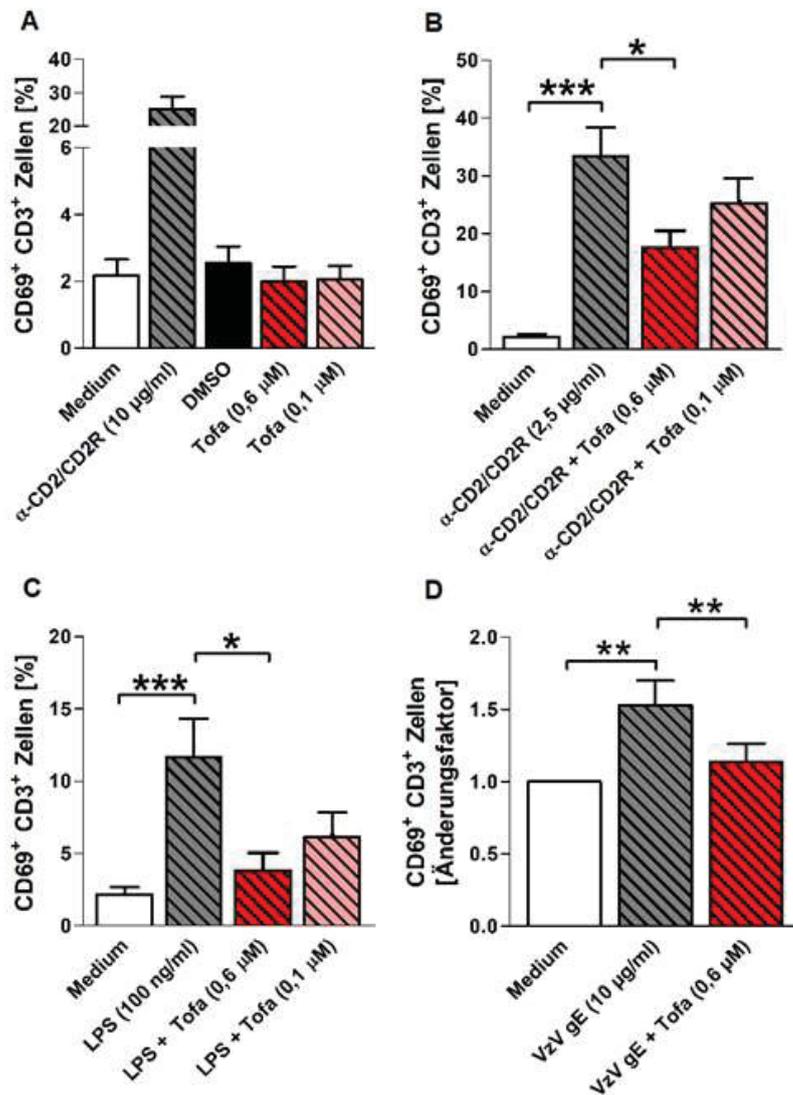


Abb. 23: Tofacitinib hemmt die T-Zell-Aktivierung

PBMCs (n= 10) wurden mit Hilfe des Lymphozytenaktivierungstests unter Zugabe verschiedener Stimulanzen getestet. Der Anteil der CD69+ CD3+ T-Zellen sollte hierbei untersucht werden. Zusätzlich wurde Tofacitinib in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,6 μM und 0,1 μM) hinzugefügt, um die Auswirkungen analysieren zu können. α-CD2/CD2R (A) dient als Kontrolle für eine positive Stimulation. Auch diese Kontrolle wurde mit Tofacitinib behandelt (B). Die übrigen Grafiken zeigen zum einen die Auswirkungen von LPS (C) und zum anderen den Effekt von VZV gE (D) auf den Anteil an CD69+ CD3+ T-Zellen. Die X-Achse zeigt hierbei die verschiedenen Bedingungen an, während auf der Y-Achse entweder der Anteil der Zellen in % oder bei Abb. 23D der Änderungsfaktor abhängig von der jeweiligen Bedingung zu erkennen ist. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie gewonnen (* entspricht P ≤ 0,05, ** entspricht P ≤ 0,01, *** entspricht P ≤ 0,001).

Im Gegensatz zur Varizella-Antigen-induzierten scheint die antimykobakterielle T-Zellantwort nicht signifikant beeinträchtigt. Mittels eines *Quantiferon-Assays* (Abb. 24) untersuchten wir, inwiefern die IFN-γ Antwort in Patienten mit latenter Tbc-Infektion durch Zugabe von Tofacitinib verändert werden kann. Die IFN-γ Antwort wurde unter Zugabe von Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM gemessen. Die IFN-γ Antwort im TB1 Röhrchen ist mit und ohne Zusatz von Tofacitinib identisch. Generell ist

die IFN- γ Antwort im TB2 Röhrchen höher als im TB1 Röhrchen. Die Zugabe von Tofacitinib hat keinen negativen Effekt auf die IFN- γ Antwort bei Patienten mit latenter Tbc *in vitro*.

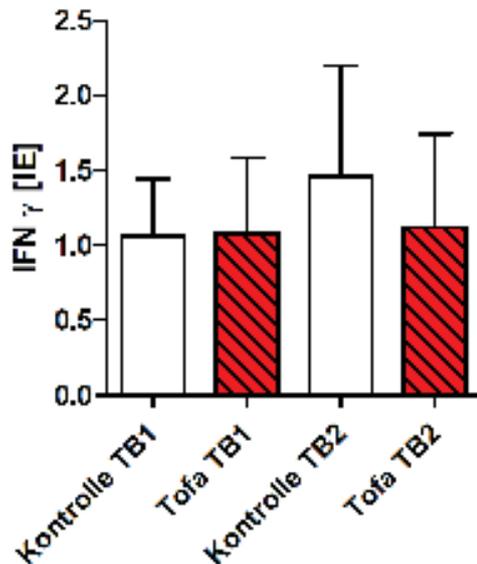


Abb. 24: IFN- γ Sekretion (QuantiFERON® Assay) in Proben von Patienten mit latenter Tuberkulose
 Fünf Blutproben von Patienten mit latenter Tbc (n= 5) wurden mit Hilfe des IGRAs (QuantiFERON® Assay) analysiert. Die X-Achse zeigt die Stimulationsbedingungen, während die Y-Achse die IFN- γ Antwort in Abhängigkeit davon in internationaler Einheit (IE) angibt.

3.4.3 Einfluss des Tofacitinibs auf die Interaktion von T-Zellen mit strukturellen Zellen

Da Tofacitinib nicht nur die Differenzierung beeinflusst, sondern auch die Aktivierung von T-Zellen hemmt, stellte sich die Frage, inwieweit sich die T-Zell induzierte Expression antiviraler bzw. antimikrobieller Peptide durch strukturelle Zellen unter Tofacitinib ändert. Hierzu wurden Keratinozyten und HFLS jeweils mit Überständen aus T-Zellkulturen stimuliert. Anschließend folgten Genexpressionsanalysen.

Die Stimulationen der Keratinozyten mit T-Zell Überständen zeigen folgende Ergebnisse: Abb. 25A zeigt die Ergebnisse für S100A7. Im Gegensatz zur Kontrolle ist ein Trend zum Expressionsanstieg des S100A7 in Keratinozyten zu erkennen, welche mit Überständen von T-Zellen behandelt wurden denen zuvor Tofacitinib hinzugefügt wurde. Auch Abb. 25B zeigt für LL37 eine leichte Zunahme der Expression unter Zusatz von Tofacitinib. Abb. 25C veranschaulicht die Expression von MX1. Diese wird durch die Zugabe von Tofacitinib (auf die T-Zellen, deren Überstände verwendet wurden) in

einer Konzentration von 600 nM gehemmt, während 100 nM Tofacitinib keinen Effekt zu haben scheint. Schließlich stellt Abb. 25D die Ergebnisse für ISG15 dar. Hier ist keine Hemmung durch die Überstände Tofacitinib behandelte T-Zellen zu erkennen, die Genexpression des AVPs nimmt durch die vorherige Zugabe von Tofacitinib 100 nM sogar leicht zu.

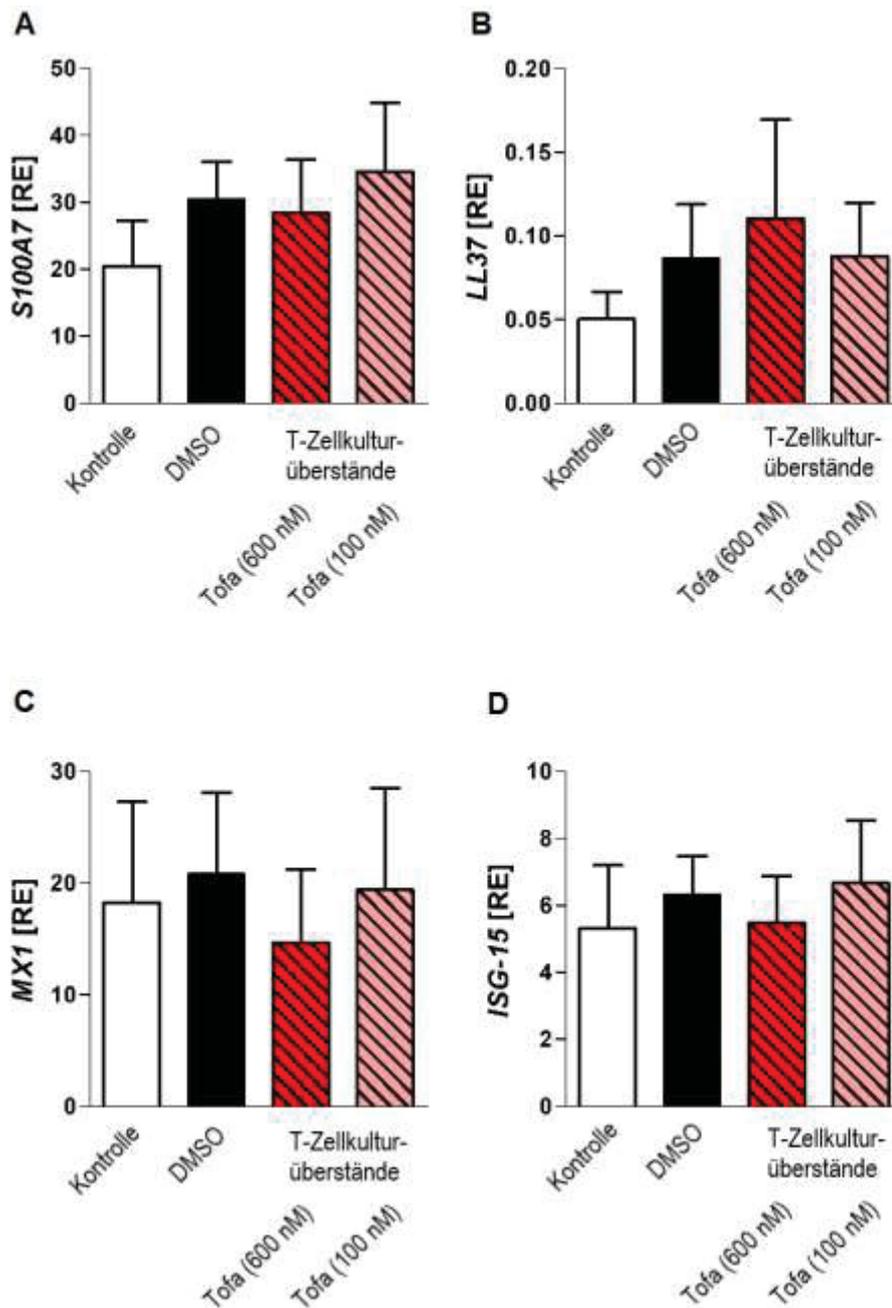


Abb. 25: Tofacitinib behandelte T-Zellkulturüberstände haben keine signifikanten Effekte auf Keratinozyten
 Keratinozyten (n=9) wurden mit T-Zell Überständen aus 9 verschiedenen T-Zell-Donoren stimuliert, um die Expression von AMPs und AVPs nach Zugabe von Tofacitinib zu überprüfen. Hierfür wurden S100A7 (A), LL37 (B), MX1 (C) und ISG15 (D) ausgewählt. Eine unbehandelte Kontrolle sowie DMSO wurden im Gegensatz zu Tofacitinib in zwei verschiedenen Konzentrationen (600 nM und 100 nM) überprüft. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulanzien aufgezeigt, während die Y-Achse die Genexpression in relativen Einheiten abhängig von den jeweiligen Faktoren zeigt. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen und ist dargestellt als Mittelwert \pm SEM relativ zur Genexpression von 18s.

Die HFLS wurden gleichermaßen stimuliert, wie zuvor für Keratinozyten beschrieben.

Abb. 26A zeigt die Expression von S100A7 in HFLS. Die Grundexpression ist mit einem Wert von knapp unter 0,2 RE sehr gering, wird jedoch durch Überstände von Tofacitinib behandelten T-Zellen in beiden Konzentrationen noch weiter gehemmt. Abb. 26B lassen sich ähnliche Ergebnisse für LL37 entnehmen. Die Genexpression der unbehandelten Zellen ist mit einem Wert etwas über 0,01 RE noch geringer, wird jedoch genau wie S100A7 durch Behandlung mit Überständen von mit Tofacitinib behandelten T-Zellen in beiden Konzentrationen noch weiter herabgesetzt. Deutlicher zeigen sich diese Ergebnisse für AVPs. Abb. 26C zeigt die Genexpression von MX1 in unbehandelten Zellen. Nach einer Zugabe von T-Zell Überständen, deren T-Zellen zuvor mit Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM oder 100 nM behandelt wurden, sinkt diese rapide ab. Während die unbehandelten Zellen eine Expression von ca. 130 RE zeigen, ergibt sich nach Zugabe von Tofacitinib je nach Konzentration ein Wert von ca. 10-25 RE. Es liegt zwar keine Signifikanz vor, es lässt sich aber ein Trend feststellen, der zeigt, dass die Überstände der Tofacitinib behandelten T-Zellen die Genexpression von MX1 in HFLS deutlich inhibieren. Aus Abb. 26D lassen sich ähnliche Ergebnisse für ISG15 ableiten. Die Genexpression von ISG15 in HFLS wird durch zuvor mit Tofacitinib behandelte T-Zell Überstände in beiden Konzentrationen ca. um die Hälfte vermindert.

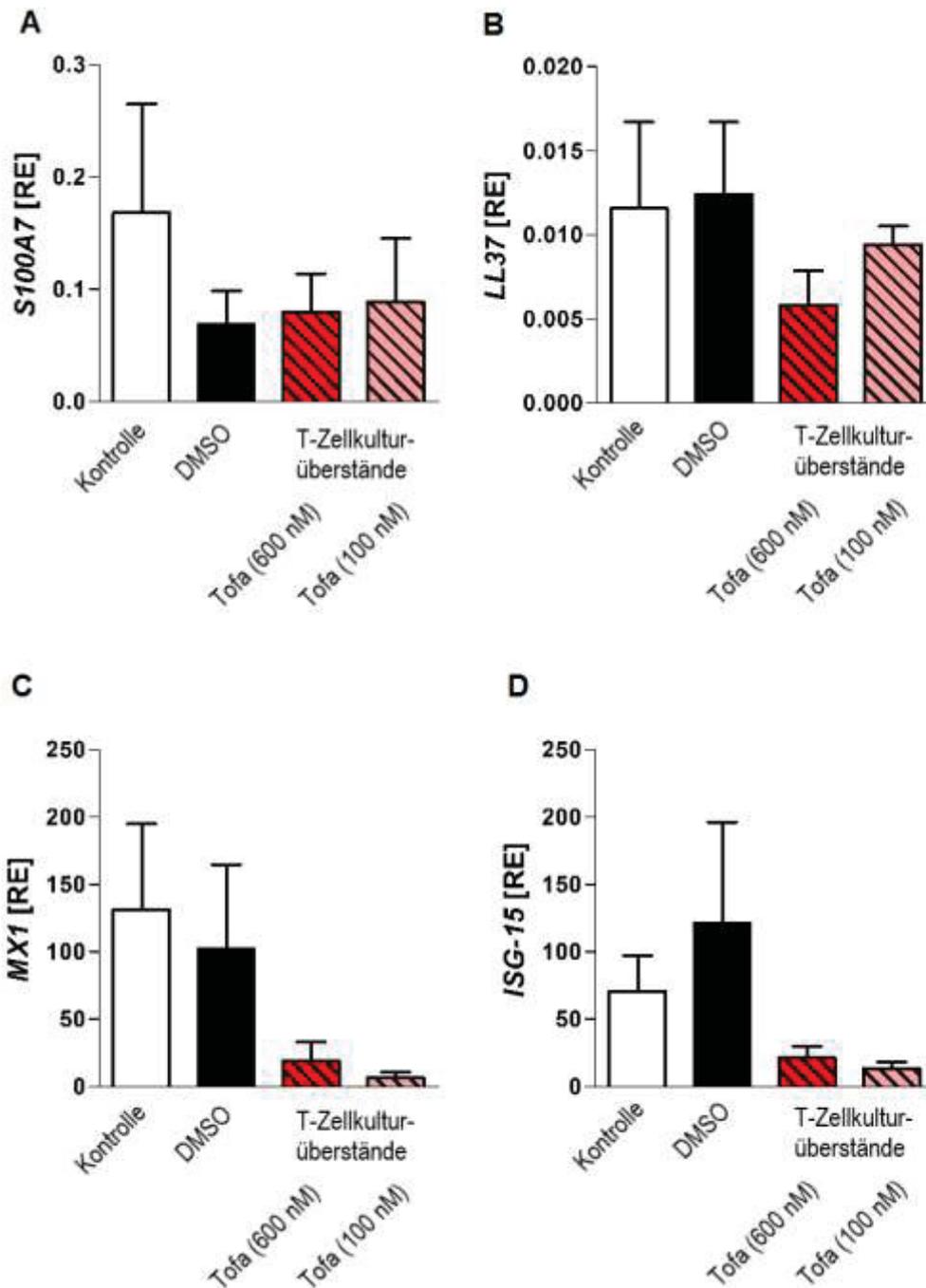


Abb. 26: Tofacitinib behandelte T-Zellkulturüberstände zeigen einen Effekt auf HFLS

HFLS (n=9) wurden mit T-Zellüberständen aus 9 verschiedenen T-Zell-Donoren stimuliert, um die Expression von AMPs und AVPs nach Zugabe von Tofacitinib zu überprüfen. Hierfür wurden S100A7 (A), LL37 (B), MX1 (C) und ISG15 (D) ausgewählt. Eine unbehandelte Kontrolle sowie DMSO wurden im Gegensatz zu Tofacitinib in zwei verschiedenen Konzentrationen (600 nM und 100 nM) überprüft. Darstellung der Achsen analog zu Abb.25.

4 Diskussion

4.1 Die Hemmung des JAK/STAT Signalwegs beeinflusst die Sezernierung von AVPs durch Keratinozyten und HFLS

In der vorliegenden Arbeit werden die Effekte einer JAK/STAT Hemmung durch das Medikament Tofacitinib beleuchtet. Hierbei war das primäre Ziel herauszufinden, inwiefern eine Hemmung dieses Signalwegs die Sezernierung von AMPs und AVPs durch Keratinozyten und HFLS beeinflusst.

Um in die Genregulation der Zelle einzugreifen, nutzt IFN- γ den JAK/STAT Signalweg [96]. Hierfür bindet das Interferon an den Typ II Zytokinrezeptor in der Zellmembran von Keratinozyten, um so die Kaskade bis zum Eingriff in die Transkription zu starten [97]. Im Anschluss können so AVPs hergestellt und ausgeschüttet werden, die einen Virus beispielsweise am Eintritt in die Zielzelle hindern können [98]. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur IFN- γ , sondern auch das primär von TH17-Zellen sezernierte IL-29 die Produktion von AVPs in Keratinozyten induziert [21]. Ob IL-29 auch in der Lage ist, die Produktion von AVPs in HFLS zu induzieren, war bislang noch unerforscht. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse dieser Arbeit, lässt sich erkennen, dass sowohl eine Stimulation mit IFN- γ , als auch mit IL-29 eine signifikante Ausschüttung von ISG-15 in HFLS (Abb.20) hervorrufen. Dies lässt vermuten, dass sich die Mechanismen in Keratinozyten der Haut auch auf die HFLS des Gelenks übertragen lassen. Die Ergebnisse von Wang *et al.* [99] zeigten bereits 2012, dass IL-29 in Geweben von Patienten mit RA vermehrt sezerniert wird und dazu führt, dass HFLS zunehmend IL-6 und IL-8 sezernieren. Eine vermehrte Sezernierung von IL-17, die zur Expression von AMPs führen könnte, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [99] und es liegen auch keine Ergebnisse vor, die eine direkte Aktivierung von AVPs in HFLS durch IL-29 bestätigen.

Im Umkehrschluss ergibt sich hierbei die Arbeitshypothese, die besagt, dass eine Hemmung des JAK/STAT Signalweges demnach verhindert, dass TH17-Zell Zytokine auf Keratinozyten und HFLS wirken können. Die Signaltransduktion entfällt und es werden keine AMPs bzw. AVPs ausgeschüttet. Gestützt wird die Hypothese durch Beobachtungen, die vermehrt virale Infektionen bei Patienten unter JAK Inhibition aufzeigen [73].

Papp *et al.* [73] zeigten in ihren Untersuchungen, dass die kurzzeitige, aber vor allem die langzeitige Exposition mit Tofacitinib zu diversen Infektionen führt. Zu den vier häu-

figsten Nebenwirkungen zählt mit 3,9% bei einer Langzeiteinnahme von 10mg täglich auch der Herpes Zoster. Anzumerken ist, dass Patienten mit latenter oder aktiver mykobakterieller Infektion von der Studie ausgeschlossen wurden. Die Nasopharyngitis war hier mit 18,9% die häufigste Nebenwirkung, auf die im Folgenden näher eingegangen wird [73].

In den durchgeführten Experimenten an Keratinozyten und HFLS konnte gezeigt werden, dass der JAK-Inhibitor Tofacitinib einen hemmenden Effekt auf die Ausschüttung von AVPs in den genannten Zelltypen hat. Die durch IFN- γ implizierte Ausschüttung von ISG-15 wird durch die Zugabe von Tofacitinib in Keratinozyten signifikant gehemmt. Bei HFLS zeigt sich hier ein starker Trend, jedoch keine Signifikanz. Auch bei Stimulation mit IL-29 zeigen die Ergebnisse einen großen Effekt des Medikaments auf die verschiedenen Zellarten. Während Tofacitinib die Expression von ISG-15 in HFLS signifikant hemmt, zeigt sich hier in Keratinozyten nur ein starker Trend. Dies deckt sich mit der Arbeitshypothese.

Aus den genannten Ergebnissen erklärt sich, wieso Patienten unter JAK-Inhibition im Vergleich zu Placebo vermehrt an viralen Infektionen leiden [100]. Die Erkenntnisse werden unter anderem von Krueger *et al.* [101] unterstützt, die beobachteten, dass Tofacitinib einen direkten Effekt auf den JAK/STAT Signalweg in Keratinozyten hat und dieser deutlich gehemmt wird [101].

Des Weiteren wurden noch andere virale Stimuli an Keratinozyten getestet, um herauszufinden, ob hier ein direkter Effekt des Medikaments zu erkennen ist. Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression des ISG15 in Keratinozyten nach Stimulation mit Varizella assoziierten Antigenen. Auch zeigen die verwendeten Stimulanzen keinen nennenswerten Effekt in Form einer antiviralen Antwort der Zelle. Es ist bekannt, dass Keratinozyten in direkter Umgebung infizierter Zellen auf eine Infektion durch Varizellen mit einer vermehrten Produktion von STAT1 reagieren, um eine antivirale Antwort zu fördern. Direkt infizierte Keratinozyten zeigten im Mausmodell jedoch eine Erhöhung von STAT3 und damit eine Ausschüttung von Survivin, welches die Apoptose der betroffenen Zelle verhindert und die Immunantwort bestehend aus einer STAT1 Erhöhung und Ausschüttung von Interferonen unterdrückt [102]. Es wäre also möglich, dass die Antigene des VzV keine Effekte auf Keratinozyten zeigen, da direkt betroffene Zellen keine entsprechende Immunantwort geben können und diese dementsprechend auch nicht zu hemmen ist.

Grundlage der Versuche war es herauszufinden, ob Keratinozyten unter JAK-Inhibition eine geringere antivirale Immunantwort aufweisen und so eine Infektion begünstigt ist.

Die Arbeitshypothese umfasste neben den diskutierten antiviralen Effekten auch zusätzlich die Wirkung einer JAK-Inhibition auf die Sezernierung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) durch Keratinozyten und HFLS. Wie bereits erwähnt treten vermehrt Infektionen als Nebenwirkung einer Therapie mit Tofacitinib auf [103], weshalb es naheliegend ist, eine JAK-Inhibition in Keratinozyten als Begründung zu sehen.

IL-22 und IL-17 sind als TH17-Zell Zytokine dafür bekannt, dass sie in Keratinozyten die Produktion von AMPs wie HBD2 und den S100 Proteinen induzieren [104]. Es ist außerdem bekannt, dass IL-22 und IL-26 über Typ II Zytokinrezeptoren und dementsprechend über JAKs auf die Zielzelle wirken [24]. In der Literatur gibt es jedoch wenige Angaben dazu, wie genau mikrobielle Stimuli wie LPS und LTA auf die Zielzelle wirken und wie genau der Anreiz zur Produktion von AMPs vermittelt wird. Die hier gezeigten Resultate lassen nur Trends in Bezug auf die Hemmung der antimikrobiellen Immunantwort von Keratinozyten unter Tofacitinib erkennen. Die Ergebnisse von Srivastava *et al.* [105] zeigten mit Signifikanz, dass IL-22 in Keratinozyten die Produktion von S100A8 und A9 fördert. Diese Erkenntnisse decken sich auch mit den Erkenntnissen dieser Arbeit. Die 2018 veröffentlichten Ergebnisse zeigen jedoch auch eine signifikante Hemmung dieser Expression durch Tofacitinib, wobei die in dieser Arbeit aufgezeigten Resultate nur einem Trend entsprechen [105].

Wieso die Ergebnisse der beiden Arbeiten nicht ähnlicher sind, kann vielerlei Gründe haben. Zum einen wurden die Keratinozyten in den Experimenten von Srivastava *et al.* aus Stanzbiopsien entnommen, wohingegen unsere Keratinozyten aus Vorhaut gewonnen wurden. Zum anderen kann es auch sein, dass eine alleinige Einwirkdauer des Medikaments auf den Keratinozyten von 60 min zu kurz ist und eine längere Inkubationszeit hier vorteilhafter gewesen wäre. In jedem Fall ist eine Hemmung der AMPs durch Tofacitinib eine mögliche Erklärung für bakterielle Infektion unter Therapie mit diesem Medikament. Fakt ist, dass in der erwähnten Arbeit nur IL-22 als alleiniger Stimulus getestet wurde. Da der Signalweg in diesem Fall gut bekannt ist, lassen sich die Ergebnisse und Hintergründe hier gut nachvollziehen.

Man geht davon aus, dass LTA sowie LAM-Mtb über den Toll-like-Rezeptor (TLR) 2 eine antibakterielle Immunantwort auslösen und auch selbst eine vermehrte Produktion des Rezeptors induzieren [106]. LPS binden dagegen an den TLR4 [107, 108]. Der weitere Signalweg umfasst NF- κ B, der als Transkriptionsfaktor die Produktion anti-

mikrobieller Peptide fördert [109]. Die durch bakterielle Antigene induzierte Signaltransduktion, macht sich den JAK/STAT-Signalweg demnach nicht zu nutze. Dies würde erklären, wieso die Ergebnisse dieser Arbeit eine deutliche Reaktion der Keratinozyten und HFLS auf die Antigene zeigen, eine JAK-Inhibition jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Produktion der AMPs hat.

Zuletzt wurden Keratinozyten und HFLS mit Überständen von Tofacitinib-behandelten T-Zellkulturen stimuliert, um zu detektieren, ob die Genexpression von AMPs bzw. AVPs durch diese strukturellen Zellen auch indirekt beeinflusst wird. Beispielhaft wurde hier die Expression von jeweils zwei AMPs und zwei AVPs untersucht. Die Zugabe von Zellkulturüberständen Tofacitinib-behandelter T-Zellen ergab bezüglich der AMPs keine Veränderung der Expression in Keratinozyten. In HFLS zeigt sich hier ein sehr geringer Effekt, der wahrscheinlich keine biologische Relevanz hat. Diese Ergebnisse decken sich mit den vorherigen Ergebnissen für den Effekt des Medikaments auf die Expression von AMPs. Die Testung der AVPs zeigte bei Keratinozyten keinen einheitlichen Effekt. Während MX1 leicht gehemmt wurde, findet sich kein Effekt auf die Expression von ISG15. In HFLS sehen die Ergebnisse anders aus. Die Zugabe von Zellkultur Überständen nach Stimulation mit dem Medikament zeigt bei beiden AVPs eine Hemmung der Expression. Zwar liegt hier ebenfalls keine Signifikanz vor, jedoch lässt sich ein Trend feststellen. Es lässt sich demnach diskutieren, ob die Ergebnisse für Keratinozyten unter anderem Umständen denen der HFLS geglichen hätten. Eine erhöhte n-Zahl könnte hier eventuell Ergebnisse mit signifikanten Werten ergeben. Zudem ist die Frage, ob die T-Zellüberstände eine längere oder kürzere Zeit ohne Tofacitinib auf die Zellen hätten einwirken sollen. Die Trends der HFLS decken sich jedoch mit den übrigen Ergebnissen.

4.2 Der Einfluss der JAK-Inhibition auf die T-Zelldifferenzierung

Das nächste Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob das Medikament Tofacitinib in seiner Eigenschaft als JAK-Inhibitor einen Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung hat. Ein spezielles Augenmerk liegt hier auf der Entwicklung der TH17-Zellen.

Die Erkenntnis, dass proinflammatorische, JAK-abhängige Zytokine wie beispielsweise IL-6 in vielen autoimmunen Erkrankungen wie der RA erhöht sind, erklärt, wieso der JAK/STAT Signalweg ein sinnvolles Ziel in der Therapie immunvermittelter Erkrankungen ist [110].

Yoshida *et al.* untersuchten im Mausmodell, dass in Mäusen, die mit niedrig dosiertem Tofacitinib behandelt wurden, mehr IL-17 pro kg Körpergewicht zu detektieren war als in Mäusen, die nicht behandelt wurden. Laut ihrer Interpretation begünstigt Tofacitinib die Differenzierung einer T-Zelle in Richtung TH17-Zelle [111]. Währenddessen lassen die Erkenntnisse von Ghoreschi *et al.* [112] gegensätzliches vermuten. Ihre Ergebnisse zeigen zwar ebenfalls, dass eine JAK-Inhibition Einfluss auf die Entwicklung von TH17-Zellen hat, allerdings fanden sie heraus, dass naive T-Zellen, die im Vorhinein mit IL-6 und IL-23 stimuliert und somit in Richtung TH17-Zelle polarisiert wurden, nach Zugabe von Tofacitinib in ihrer Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 blockiert waren. Der IL-23 Rezeptor betroffener Zellen war ebenfalls blockiert [112]. Dass die für TH17-Zellen typische Zytokine deutlich weniger sezerniert wurden, lässt darauf schließen, dass eine Entwicklung zu diesem Zelltyp durch die JAK-Inhibition verhindert wurde. Es gibt demnach entgegengesetzte Hypothesen zur genauen Wirkung des Medikaments auf die Differenzierung der TH17-Zellen.

Die Forscher um Ghoreschi fanden ebenfalls heraus, dass die Rolle von TGF- β untergeordnet ist, wenn es um die Differenzierung zu einer TH17-Zelle geht. Ihre Erkenntnisse zeigten außerdem, dass weder IL-23 noch IL-6 alleine in der Lage sind, eine IL-17 produzierende T-Zelle zu induzieren und dass dies nur in Kombination mit IL-1 β möglich ist [113]. Jedoch unterschieden sie hierbei nicht zwischen klassischen und eher pathogenen TH17-Zellen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basieren auf der Hypothese, dass zwei verschiedene TH17-Zelltypen existieren, wobei zwischen einer klassischen, regulierten und einer pathogen, autoimmun wirksamen Form zu unterscheiden ist [16].

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Tofacitinib durch JAK-Inhibition die Differenzierung zum Vorteil des klassischen Typs begünstigt und so die positive Auswirkung in

Patienten mit RA teils mit erklären kann. Diese Hypothese stützt sich auf die Erkenntnisse von Peters *et al.* [16], die erklären, dass eine Inhibition des IL-23 die Entstehung einer klassischen TH17-Zelle fördert [16]. Sie wiederum stützen sich hierbei auf die Ergebnisse von Hirota *et al.* [114], die herausfanden, dass die T-bet und IFN- γ Expression einer TH17-Zelle abhängig von IL-23 ist, wo hingegen die Anwesenheit von TGF- β die Expression inhibiert [114]. Die Arbeitsgruppe um Lee *et al.* [14] unterschied zwischen TGF- β 1 und 3 und kam wie anfangs erwähnt zu der Schlussfolgerung, dass Th17-Zellen in der Anwesenheit von IL-23 TGF- β 3 produzieren und eher pathogen sind. Des Weiteren fanden sie heraus, dass eine klassische TH17-Zelle in Anwesenheit von IL-23 ebenfalls pathogen wird. Außerdem zeigten sie auf, dass auch ohne IL-23, nämlich allein durch die Anwesenheit von IL-6 und TGF- β 3, eine pathogene TH17-Zelle entstehen kann [14]. Beide Arbeitsgruppen sind sich jedoch einig, dass es zwei verschiedene Typen TH17-Zellen gibt, die hinsichtlich ihrer Pathogenität und autoimmunen Aktivität zu unterscheiden sind. Über die Entstehung einer klassischen TH17-Zelle durch TGF- β 1 und IL-6 herrscht ebenfalls Einigkeit.

Um unsere Arbeitshypothese zu beleuchten, wurde der Effekt von Tofacitinib auf die Genexpression in T-Zellen getestet. Die Ergebnisse zeigen jedoch leider keine Signifikanzen. Der Effekt auf die IFN- γ Expression ist heterogen. Während Tofacitinib in einer Konzentration von 600 nM die Genexpression leicht absinken lässt, scheint die Zugabe von 100 nM Tofacitinib die Expression des Interferons zu fördern. Der Effekt auf die IL-22 Expression bestätigt die Hypothese ebenfalls nicht. Zudem muss gesagt werden, dass die Expression von IL-22 mit $<0,1$ RE an sich schon sehr gering ist und durch die Zugabe von Tofacitinib auch nur minimal beeinflusst wird. Die T-bet Genexpression wird durch die Zugabe von Tofacitinib nur geringfügig erhöht, so dass eine biologische Relevanz fraglich erscheint. Die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 ist zwar höher, allerdings ist der Effekt des Medikaments auch hier kaum nennenswert. Im Gegensatz dazu deckt sich aber die erhöhte Expression von *RORC* unter der Zugabe von Tofacitinib mit der Hypothese, da dieses Gen, welches für den Transkriptionsfaktor ROR- γ T codiert, vermehrt in klassischen TH17-Zellen vorhanden ist [16]. Jedoch liegt auch hier keine Signifikanz vor. Die Ergebnisse dieses Versuchs liefern demnach keinen endgültigen Beweis für die Arbeitshypothese. Es wäre eventuell vorteilhafter gewesen, die T-Zellen über eine noch längere Zeit ihrer Differenzierung zu überlassen, da sie sich zum Zeitpunkt der Medikamentenzugabe möglicherweise noch in einem sehr plastischen Zustand befanden. Die Zugabe von IL-23, IL-6 und IL-2 ist ebenfalls zu diskutieren. Eine Erklärung könnte sein, dass auch der IL-2 Rezeptor zu 90% JAK

abhängig arbeitet [115]. Kommt das Medikament also zu früh auf die sich differenzierende T-Zelle, könnte durch die JAK-Inhibition im IL-2 Rezeptor so ein unerwünschter Effekt hervorgerufen werden, indem es zu keiner TH17-Zelldifferenzierung kommt. Allerdings lässt sich so eventuell auch der positive Effekt des Tofacitinibs erklären. Wenn der IL-2 Rezeptor zumindest teilweise gehemmt wird, sind T-Zellen in ihrer Differenzierung gestört [115]. Speziell in Patienten mit RA könnte dies eine Verbesserung der Symptome unter JAK-Inhibition erklären.

Die Komplexität des JAK/STAT-Signalweges verdeutlicht sich, wenn man bedenkt, dass der IL-10 Rezeptor ebenfalls ein Typ II Zytokin Rezeptor ist. Genau wie auch IFN- γ wird nach der Bindung an den Rezeptor der JAK/STAT-Signalweg zur Signaltransduktion verwendet [116]. Trotz dieser Gemeinsamkeiten ist die Wirkung der Zytokine gegensätzlich. Während IFN- γ primär von TH1- und vermeintlich autoimmun wirksamen TH17-Zellen sezerniert wird und für seine proinflammatorische, antivirale Funktion bekannt ist, wird IL-10 als das primäre Interleukin der Treg-Zellen eingestuft und inhibiert die Produktion von IFN- γ [117]. Zudem geht man davon aus, dass eine höhere Konzentration von IL-10 in TH17-Zellen den klassischen Typ in der Differenzierung fördert. Auch in diesem Fall würde eine zu frühe Hinzugabe des Tofacitinibs auf die in Differenzierung befindlichen T-Zellen womöglich die Ergebnisse verfälschen.

Die T-Zellen wurden jedoch auch einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Im Gegensatz zur den nicht signifikanten Ergebnissen der Expressionsanalysen der Transkriptionsfaktoren zeigen diese Ergebnisse eindrucksvoll, dass Tofacitinib einen Einfluss auf den Anteil an der Ausbildung unterschiedlicher TH17-Zellpopulationen, nämlich IL-17+ CD4+ T-Zellen und IL26+ CD4+ T-Zellen, hat. Eine Zugabe des Medikaments auf die T-Zellen ergab für IL-17+ CD4+ T-Zellen eine vermehrte Zellzahl mit einem Änderungsfaktor von 2-2,6, je nach Konzentration. Gegensätzliches ergab sich für den Anteil der IL-26+ CD4+ T-Zellen an der Gesamtzellzahl. Tofacitinib hemmt die Entstehung dieses Zelltyps signifikant. Wenn man davon ausgeht, dass IL-17 hauptsächlich von klassischen TH17-Zellen produziert wird, was den Schlussfolgerungen von Peters *et al.* entspricht [16], würde dies bedeuten, dass Tofacitinib die Ausprägung des klassischen Zelltyps fördert. IL-26 dagegen gehört wie IL-22 zur IL-10 Zytokin-Familie [118]. IL-26 ist ein Protein mit antimikrobiellen Eigenschaften und tötet beispielsweise *E.coli* oder *S.aureus* ab, indem es die Integrität der bakteriellen Membran stört [22]. Es lässt sich also sagen, dass es sich bei IL-26 um ein antimikrobielles Protein handelt, dass aber auch autoimmune Entzündungsprozesse unterstützen kann [22]. Neuste Erkenntnisse von Weiss *et al.* zeigten zudem, dass IL-1 β notwendig ist,

damit eine TH17-Zelle IL-26 produziert [119]. Nach den Feststellungen von Peters *et al.* ist IL-1 β , wie im Vorherigen erwähnt, mit für die Entstehung einer eher pathogenen TH17-Zelle verantwortlich [16]. Demnach könnte man annehmen, dass IL-26 ebenso wie IL-22 zu den Zytokinen einer eher pathogenen TH17-Zelle gehört. Die signifikante Hemmung IL26+ CD4+ T-Zellen könnte demnach bedeuten, dass Tofacitinib die Differenzierung zum pathogenen Zelltyp hemmt.

4.3 Einfluss der JAK-Inhibition auf die T-Zellaktivierung

Um den Einfluss des Tofacitinibs auf die T-Zellaktivierung zu prüfen, verwendeten wir einen sogenannten Lymphozytenaktivierungstest (LAT). Der LAT ist ein durchflusszytometrisches Verfahren, das nach Inkubation mit entsprechenden Stimulantien die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD3+ Zellen misst. Es zeigte sich, dass Tofacitinib effektiv die Aktivierung durch die Positivkontrollen α -CD2/CD28 und LPS reduziert. Da unter Tofacitinibtherapie ein gehäuftes Auftreten von Herpes zoster beobachtet wurde, lag unser besonderes Augenmerk darauf zu detektieren, ob antigen-spezifische T-Zellen unter Tofacitinib ebenfalls eine herabgesetzte Aktivierung zeigen. Um die antivirale Aktivität zu testen, wurde hier VzV gE verwendet. Es zeigt sich bei Zugabe des Antigens ein Änderungsfaktor von 1,5, was einem signifikanten Anstieg der CD69+ Zellen entspricht und eine Antigen-spezifische Aktivierung bedeutet. Die Zugabe von Tofacitinib reduziert diesen Wert wieder signifikant auf 1. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Tofacitinib nicht nur die Produktion von AVPs hemmt, sondern dass auch direkt die Aktivierung der Immunzellen gehemmt wird, so dass Infektionen leichter entstehen können.

Tofacitinib hemmt also nicht nur die angeborene Immunreaktion durch Reduktion der Expression von AVPs durch strukturelle Zellen, sondern auch adaptive Immunantworten durch Inhibition der Aktivierung VzV-spezifischer T-Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigt sich kein signifikanter Einfluss des Tofacitinibs auf die Aktivierung Tuberkulose-spezifischer T-Zellen im IGRA. Diese Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit latenter Tbc *in vitro* nicht in ihrer IFN- γ Antwort gehemmt sind. Da Patienten, welche mit TNF- α Inhibitoren behandelt wurden, ein erhöhtes Tbc-Risiko aufweisen [120], sollte der IGRA an dieser Stelle zeigen, ob selbiges auch für Tofacitinib-Patienten gilt. In der Studie von Papp *et al.* wurden Patienten mit latenter Tbc, wie erwähnt, im Vorfeld ausgeschlossen [73]. Die Ergebnisse des IGRA lassen für Patienten mit latenter Tbc *in vitro* nicht auf ein erhöhtes Tbc-Risiko unter Tofacitinib-Therapie schließen.

4.4 Schlussfolgerungen

Schlussendlich lässt sich sagen, dass wir mit dieser Arbeit ein besseres Verständnis für das Auftreten typischer Nebenwirkungen des Medikaments Tofacitinib erlangt haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des JAK/STAT Signalweges tatsächlich einen negativen Einfluss auf die Sezernierung von AVPs in Keratinozyten und HFLS sowie auf die Aktivierung VzV-spezifischer T-Zellen hat. Während andere Arbeitsgruppen dies auch für gewisse AMPs mit Signifikanz beweisen konnten, können wir in der vorliegenden Arbeit nur von Trends sprechen. Trotz allem lassen sich hieraus Erkenntnisse für den klinischen Alltag ziehen. Ist eine Therapie mit Tofacitinib geplant, so sollten betroffene Patienten im Vorfeld hinsichtlich ihres Impfstatus überprüft werden. Eine vorherige Impfung gegen Varizellen wäre beispielsweise ein hilfreicher Schritt, um eine spätere Infektion des Patienten unter JAK/STAT Inhibition zu verhindern. Außerdem sollten Patienten darüber aufgeklärt werden, dass generell ein erhöhtes Risiko viraler und möglicherweise auch bakterieller Infektionen besteht und sie dahingehend Vorkehrungen treffen sollten, um das Risiko einer Infektion zu verringern.

Inwieweit Tofacitinib die Differenzierung von TH17-Zellen beeinflusst, wird kontrovers diskutiert. Allein die Überlegung, ob zwei Subtypen dieses TH-Zelltyps existieren, stößt auf Uneinigkeit der einzelnen Forschungsgruppen. Unsere Hypothese vertritt zum einen den Standpunkt, dass es einen eher klassischen und einen eher pathogenen Zelltyp gibt, zum anderen lassen die vorliegenden Ergebnisse die Vermutung zu, dass Tofacitinib den klassischen Zelltyp fördert und die Entstehung des pathogenen Subtyps inhibiert. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um diesem Aspekt auf den Grund zu gehen. Fest steht jedoch, dass Tofacitinib die Immunantwort in Form von aktivierten TH-Zellen, ausgelöst durch virale Stimulanzen, signifikant inhibiert.

Im Wirkspektrum des omnipräsenten JAK/STAT Signalwegs gilt es demnach noch vieles endgültig zu erörtern, sodass er eines Tages in all seiner Komplexität verstanden werden kann.

5 Literatur-und Quellenverzeichnis

1. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
2. Health, P., *How does the immune system work?* 2010, IQWiG (Institute for Quality and Efficiency in Health Care).
3. Hamilos, D., *Antigen presenting cells*. National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, Colo., USA, 1989.
4. Winslow, T., *Hematopoietic Tree, Expanded Lymphoid Line*. 2007.
5. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T Cells and Immune Tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-787.
6. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
7. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
8. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**: p. 235.
9. Homey, B., *Nach TH1/TH2 kommt nun Treg/TH17 Bedeutung von T-Helfer-Zellen in der Organisation von Immunantworten*. Hautarzt Springer Medizin Verlag 2006, 2006.
10. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
11. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 652-7.
12. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
13. McGeachy, M.J., et al., *TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1390-7.
14. Lee, Y., et al., *Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells*. Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 991-9.
15. Bettelli, E., et al., *Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 79-87.
16. Peters, A., Y. Lee, and V.K. Kuchroo, *The many faces of Th17 cells*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(6): p. 702-6.
17. Codarri, L., et al., *RORgammaT drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 560-7.
18. Yao, Z., et al., *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5483-6.
19. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
20. Wright, J.F., et al., *Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13447-55.
21. Wolk, K., et al., *IL-29 is produced by T(H)17 cells and mediates the cutaneous antiviral competence in psoriasis*. Sci Transl Med, 2013. **5**(204): p. 204ra129.

22. Meller, S., et al., *T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26*. Nat Immunol, 2015. **16**(9): p. 970-9.
23. Nograles, K.E., et al., *Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1092-102.
24. Renaud, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 667-76.
25. Gough, D.J., et al., *IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT?* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(5-6): p. 383-94.
26. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 2): p. 297-314.
27. Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker, *JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20059-63.
28. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**: p. 238.
29. Watson, P.H., E.R. Leygue, and L.C. Murphy, *Psoriasin (S100A7)*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(5): p. 567-71.
30. Glaser, R., et al., *Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 57-64.
31. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
32. Zhang, L.-j. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides*. Current Biology, 2016. **26**(1): p. R14-R19.
33. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
34. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 861.
35. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 63-8.
36. Doyle, S.E., et al., *Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes*. Hepatology, 2006. **44**(4): p. 896-906.
37. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
38. Sadler, A. and B. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Us National Library of Medicine 2009.
39. Hsiang, T.Y., C. Zhao, and R.M. Krug, *Interferon-induced ISG15 conjugation inhibits influenza A virus gene expression and replication in human cells*. J Virol, 2009. **83**(12): p. 5971-7.
40. Morales, D.J. and D.J. Lenschow, *The Antiviral Activities of ISG15*. Journal of Molecular Biology, 2013. **425**(24): p. 4995-5008.
41. Okumura, A., et al., *Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(5): p. 1440-1445.
42. Verhelst, J., et al., *Interferon-Inducible Protein Mx1 Inhibits Influenza Virus by Interfering with Functional Viral Ribonucleoprotein Complex Assembly*. Journal of Virology, 2012. **86**(24): p. 13445-13455.
43. Haller, O., et al., *Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus*. 1980. **283**(5748): p. 660-662.
44. Hunter, T., et al., *The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates*. J Biol Chem, 1975. **250**(2): p. 409-17.

45. Mullan, P.B., et al., *The 2,5 oligoadenylate synthetase/RNaseL pathway is a novel effector of BRCA1- and interferon-gamma-mediated apoptosis*. *Oncogene*, 2005. **24**(35): p. 5492-501.
46. Smith, J.A., et al., *Involvement of the interferon-regulated antiviral proteins PKR and RNase L in reovirus-induced shutoff of cellular translation*. *J Virol*, 2005. **79**(4): p. 2240-50.
47. Arda, O., N. Göksügür, and Y. Tüzün, *Basic histological structure and functions of facial skin*. *Clinics in Dermatology*, 2014. **32**(1): p. 3-13.
48. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.-M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. *Experimental Dermatology*, 2008. **17**(12): p. 1063-1072.
49. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. *Nature reviews. Immunology*, 2009. **9**(10): p. 679-691.
50. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2003. **121**(2): p. 231-41.
51. Palmer, C.N., et al., *Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis*. *Nat Genet*, 2006. **38**(4): p. 441-6.
52. Downing, D.T., et al., *Skin lipids: an update*. *J Invest Dermatol*, 1987. **88**(3 Suppl): p. 2s-6s.
53. Taniguchi, K., et al., *Periostin controls keratinocyte proliferation and differentiation by interacting with the paracrine IL-1alpha/IL-6 loop*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(5): p. 1295-1304.
54. Peters, J.H., et al., *Co-culture of healthy human keratinocytes and T-cells promotes keratinocyte chemokine production and RORgammat-positive IL-17 producing T-cell populations*. *J Dermatol Sci*, 2013. **69**(1): p. 44-53.
55. Giustizieri, M.L., et al., *Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**(5): p. 871-7.
56. Dragon, S., et al., *IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **292**(4): p. L1023-9.
57. Lebre, M.C., et al., *Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(2): p. 331-41.
58. Miller, L.S. and R.L. Modlin, *Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(2): p. 262-3.
59. Schumacher, M., et al., *Efficient keratinocyte differentiation strictly depends on JNK-induced soluble factors in fibroblasts*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(5): p. 1332-1341.
60. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus-Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme Verlag, 2007. **2. überarbeitete Auflage**.
61. Bartok, B. and G.S. Firestein, *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. *Immunological reviews*, 2010. **233**(1): p. 233-255.
62. Edwards, J.C. and D.A. Willoughby, *Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1982. **41**(2): p. 177-182.
63. Bottini, N. and G.S. Firestein, *Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors*. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. **9**(1): p. 24-33.
64. Ruffilli, I., et al., *Psoriasis, Psoriatic Arthritis, and Thyroid Autoimmunity*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017. **8**: p. 139.
65. Veale D.J., F.O., *Psoriatic arthritis - Pathogenesis and epidemiology*. *Rheumatology online*, 2002.

66. Tokura, Y., T. Mori, and R. Hino, *Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases*. J uoeh, 2010. **32**(4): p. 317-28.
67. Perera, G.K., P.D. Meglio, and F.O. Nestle, *Psoriasis*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2012. **7**(1): p. 385-422.
68. Scarpa, R., et al., *Psoriatic arthritis in psoriatic patients*. Br J Rheumatol, 1984. **23**(4): p. 246-50.
69. Veale, D., S. Rogers, and O. Fitzgerald, *Classification of clinical subsets in psoriatic arthritis*. Br J Rheumatol, 1994. **33**(2): p. 133-8.
70. Gladman, D.D., *Natural history of psoriatic arthritis*. Baillieres Clin Rheumatol, 1994. **8**(2): p. 379-94.
71. Strand, V., et al., *Long-Term Radiographic and Patient-Reported Outcomes in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Tofacitinib: ORAL Start and ORAL Scan Post-hoc Analyses*. Rheumatol Ther, 2018.
72. Gabriel, S.E. and K. Michaud, *Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. 229.
73. Papp, K.A., et al., *Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, for the treatment of chronic plaque psoriasis: results from two randomized, placebo-controlled, phase III trials*. Br J Dermatol, 2015. **173**(4): p. 949-61.
74. Lamba, M., et al., *Extended-Release Once-Daily Formulation of Tofacitinib: Evaluation of Pharmacokinetics Compared With Immediate-Release Tofacitinib and Impact of Food*. J Clin Pharmacol, 2016. **56**(11): p. 1362-1371.
75. Limited, P., *Fachinformation Xeljanz 5mg Filmtabletten*. 2017.
76. Meyer, D.M., et al., *Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 41.
77. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-11.
78. Tanaka, T., M.A. Soriano, and M.J. Grusby, *SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling*. Immunity, 2005. **22**(6): p. 729-36.
79. Walker, J.G., et al., *Changes in synovial tissue Jak-STAT expression in rheumatoid arthritis in response to successful DMARD treatment*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(12): p. 1558-64.
80. Martina, M.N., et al., *Inhibition of JAK3 and PKC via Immunosuppressive Drugs Tofacitinib and Sotrastaurin Inhibits Proliferation of Human B Lymphocytes In Vitro*. Transplant Proc, 2016. **48**(9): p. 3046-3052.
81. Hope-Simpson, R.E., *The Nature of Herpes Zoster: A Long-term Study and a New Hypothesis*. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1965. **58**(1): p. 9-20.
82. Kennedy, P.G.E., et al., *A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation*. The Journal of General Virology, 2015. **96**(Pt 7): p. 1581-1602.
83. Shivangi and L.S. Meena, *A Novel Approach in Treatment of Tuberculosis by Targeting Drugs to Infected Macrophages Using Biodegradable Nanoparticles*. Appl Biochem Biotechnol, 2018.
84. Ortiz de Montellano, P.R., *Potential drug targets in the Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 system*. J Inorg Biochem, 2018.
85. Sengar, D.P., F.N. Jerome, and R.J. Douglas, *A simple method for separation of buffy coat from peripheral blood of chickens*. Can J Comp Med, 1968. **32**(4): p. 593-7.
86. BD, *PAS_BC_Vacutainer- CPT-System_BR_DE*. p. 2.

87. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
88. Corporation, P., *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin*.
89. Qiagen, *RNeasy® Mini Kit Handbook 4th Edition*. 2012.
90. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(2): p. 120-126.
91. FastImmune™, B., *Monoclonal Antibodies Detecting Human Antigens CD69/CD3*.
92. Testi, R., et al., *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 479-83.
93. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
94. Qiagen, *QuantiFERON-TB Gold Brochure*. p. 8.
95. Gärtner, M.L.R.L.D., *aktuelle Laborinformation: Umstellung des Quantiferon-TB-Gold-Tests (QFT®) auf den Quantiferon-TB-Gold-Plus-Test (QFT®-Plus)*. 2017: p. 2.
96. Subramaniam, P.S., B.A. Torres, and H.M. Johnson, *So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors*. Cytokine, 2001. **15**(4): p. 175-87.
97. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. 1990.
98. Jones, J.C., et al., *Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 11960-7.
99. Wang, F., et al., *Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2012. **14**(5): p. R228.
100. *Tofacitinib in Combination With Nonbiologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Patients With Active Rheumatoid Arthritis*. Annals of Internal Medicine, 2013. **159**(4): p. 253-261.
101. Krueger, J., et al., *Tofacitinib attenuates pathologic immune pathways in patients with psoriasis: A randomized phase 2 study*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(4): p. 1079-1090.
102. Zerboni, L. and N. Sen, *Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis*. Nat Rev Microbiol., 2014.
103. Thomas, K. and D. Vassilopoulos, *Infections in Patients with Rheumatoid Arthritis in the Era of Targeted Synthetic Therapies*. Mediterranean journal of Rheumatology, 2020.
104. Kao, C.Y., et al., *IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3482-91.
105. Srivastava, A., et al., *Tofacitinib Represses the Janus Kinase-Signal Transducer and Activators of Transcription Signalling Pathway in Keratinocytes*. Acta Derm Venereol, 2018. **98**(8): p. 772-775.
106. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33419-25.
107. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
108. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.

109. O'Neill, L.A. and C. Greene, *Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 650-7.
110. Calabrese, L.H. and S. Rose-John, *IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(12): p. 720-7.
111. Yoshida, H., et al., *Low dose CP-690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **418**(2): p. 234-40.
112. Ghoreschi, K., et al., *Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550)*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(7): p. 4234-4243.
113. Ghoreschi, K., et al., *Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 967-71.
114. Hirota, K., et al., *Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 255-63.
115. Ross, S.H., C. Rollings, and K. Anderson, *Phosphoproteomic Analyses of Interleukin 2 Signaling Reveal Integrated JAK Kinase-Dependent and -Independent Networks in CD8+ T Cells*. Immunity, 2016.
116. Kotenko, S.V. and S. Pestka, *Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2557-65.
117. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
118. Fickenscher, H., et al., *The interleukin-10 family of cytokines*. Trends Immunol, 2002. **23**(2): p. 89-96.
119. Weiss, D.I., et al., *IL-1beta Induces the Rapid Secretion of the Antimicrobial Protein IL-26 from Th17 Cells*. J Immunol, 2019.
120. Askling, J., et al., *Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(7): p. 1986-92.

5.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Keratinozyten Stimulanzen für Genexpression mit Angabe der finalen Konzentration	28
Tabelle 2: T-Zell Stimulanzen für Genexpression mit Angabe der finalen Konzentration	32
Tabelle 3: T-Zell-Überstände auf Keratinozyten oder HFLS	34
Tabelle 4: MTT-Verdünnungsreihe von Tofacitinib und DMSO	36
Tabelle 5: CellTiter-Glo® -Verdünnungsreihe der T- Zellen	38
Tabelle 6: cDNA-Synthese Mix 1	41
Tabelle 7: cDNA-Synthese Mix 2	41
Tabelle 8: cDNA-Synthese Mix 3	42
Tabelle 9: Finaler Mix für TaqMan™ basierte qPCR	44
Tabelle 10: Finaler Mix für 18s TaqMan™ basierte qPCR	45
Tabelle 11: Finaler Mix für AOD basierte qPCR.....	45
Tabelle 12: Finaler Mix für SYBR™ Green basierte qPCR	46
Tabelle 13: Auflistung der Primersequenzen und AOD Nummern	47
Tabelle 14: Stimulanzen unter Angabe der Konzentration und des verwendeten Volumens	49
Tabelle 15: Kontrollen für die Durchflusszytometrie	50
Tabelle 16: Genexpression antimikrobielle Peptide in Keratinozyten.....	59
Tabelle 17: Genexpression antimikrobieller Peptide in HFLS	62
Tabelle 18: Genexpression antiviraler Peptide in Keratinozyten.....	66
Tabelle 19: Genexpression antiviraler Peptide in HFLS	68

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Blutzellentwicklung	2
Abb. 2: Differenzierung einer CD4+ T-Zelle in effektorische oder regulatorische T-Zellen.....	4
Abb. 3: Induktion antimikrobieller und antiviraler Peptide durch TH-17-Zellen	9
Abb. 4: Die Zellen der oberen Hautschichten	12
Abb. 5: Struktur des Medikaments Tofacitinib	19
Abb. 6: JAK/STAT Signalweg	20
Abb. 7: Hypothese	23
Abb. 8: Funktionsweise des CellTiter-Glo® anhand von ATP	37
Abb. 9: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	40
Abb. 10: Ablauf einer PCR mit schematischer Darstellung der drei Schritte	43
Abb. 11: Tofacitinib hat keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität.....	54
Abb. 12: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in Keratinozyten nach Stimulation mit LPS und LTA	56
Abb. 13: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in Keratinozyten nach Stimulation mit ESAT-6 + CFP-10 und LAM Mtb.....	57
Abb. 14: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in Keratinozyten nach Stimulation mit IL-17 und IL-22	58
Abb. 15: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in HFLS nach Stimulation mit LPS und LTA.....	60

Abb. 16: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in HFLS nach Stimulation mit ESAT-6 + CFP-10 und LAM Mtb	61
Abb. 17: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression von S100A7 in HFLS nach Stimulation mit auf IL-17 und IL-22	61
Abb. 18: Tofacitinib inhibiert die Expression von ISG15 in Keratinozyten nach Stimulation mit IFN- γ und IL-29	64
Abb. 19: Tofacitinib hat keinen Effekt auf die Expression des ISG15 in Keratinozyten nach Stimulation mit Varizella assoziierten Antigenen.....	65
Abb. 20: Tofacitinib inhibiert die IFN- γ und IL-29 abhängige Expression von ISG-15 in HFLS.....	67
Abb. 21: Tofacitinib zeigt geringe Effekte auf die Genexpression in T-Zellen.....	70
Abb. 22: Tofacitinib erhöht den Anteil von IL-17+ und reduziert den Anteil IL-26+ CD4+ T-Zellen.....	71
Abb. 23: Tofacitinib hemmt die T-Zell-Aktivierung	72
Abb. 24: IFN- γ Sekretion (QuantiFERON® Assay) in Proben von Patienten mit latenter Tuberkulose	73
Abb. 25: Tofacitinib behandelte T-Zellkulturüberstände haben keine signifikanten Effekte auf Keratinozyten	75
Abb. 26: Tofacitinib behandelte T-Zellkulturüberstände zeigen einen Effekt auf HFLS.....	77

6 Anhang

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Stephan Meller für die nette Betreuung und das Bereitstellen des Themas danken. Danke, dass ich mich immer mit Problemen an dich wenden durfte. Außerdem danke ich meiner lieben Betreuerin Dr. Heike Hawerkamp für die Hilfe im Labor und die allgegenwärtige Unterstützung sogar von Dublin aus. Ein besonderer Dank gilt Lisa Radau für die gemeinsame Zeit in der Dermatologie. Danke für die schönen Erinnerungen an diese tolle gemeinsame Zeit und die tolle Zusammenarbeit.

Zudem möchte ich mich bei Henrike Ehrlich, Efterpi-Maria Sampani und Dr. Miriam Tienken der ehemaligen Ernst-Derra Straße, und außerdem bei Dr. Laura Damaschin für fleißige Blutspenden und mentalen Support bedanken. Vielen Dank natürlich auch für die ein oder andere Ablenkung vom Laboralltag. Besonders danke ich natürlich auch Eva Hartmann für Korrekturlesen und tagtäglichen Beistand über die Promotion hinaus.

Danke an David Weiß, Marina Belova, André Fangerau, Jan Winter und Philipp Yuan für Freundschaft und Unterstützung während Studium und Promotion.

Natürlich bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, im Speziellen bei Christel, Klaus, Barbara, Eberhard, Annika, Samuel und Elke für den Rückhalt, den ich erfahren durfte. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Ganz wesentlich zu dieser Promotion hat jedoch auch das geduldige Korrekturlesen meiner Mutter beigetragen, für das ich mich auf diesem Wege ganz herzlich bedanken möchte.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinem Mann, Kevin Domdey, der mich bei dieser Promotion genauso wie in allen anderen Lebenslagen so fantastisch unterstützt hat und nie aufgehört hat, an mich zu glauben.