

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

**Analyse potentieller Einschränkungen der
Infektionsabwehr unter Inhibition der
Phosphodiesterase-4**

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin**

**der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Lisa Radau

(2022)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Stephan Meller

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Martin Wagenmann

Für meinen Opa Dr. Reinhard Küper

Zusammenfassung

Psoriasis ist eine chronisch entzündliche, autoimmune Hauterkrankung, die sich mit sichtbaren roten Plaques auf der Haut manifestiert und an der ca. 2 bis 3 % der Bevölkerung leiden. Sie führt zu einer deutlichen Lebensqualitätseinschränkung und ist vergesellschaftet mit einer Reihe weiterer Erkrankungen, vor allem mit der Psoriasis-Arthritis (PsA), bei der zunächst meist die kleinen Gelenke betroffen sind. Die Psoriasis, wie auch die Psoriasis-Arthritis, werden durch eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren unter anderem Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-17 oder IL-22 bestimmt. Für die Behandlung der Psoriasis und Psoriasis-Arthritis steht unter anderem der oral einzunehmende Wirkstoff Apremilast, ein selektiver Phosphodiesterase 4 (PDE4)-Inhibitor, zur Verfügung. Durch die Hemmung der PDE4 kommt es zu einer verminderten Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IFN- γ und zu gesteigerter Transkription antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10. Trotz generell guter Verträglichkeit von Apremilast werden bei der Therapie Infektionen der oberen Atemwege als Nebenwirkungen beobachtet.

Diese infektiösen Nebenwirkungen wurden zum Anlass genommen, in dieser Arbeit die Wirkung von Apremilast auf die antimikrobielle und antivirale Abwehr auf Keratinozyten, Synoviozyten und T-Zellen zu untersuchen, die jeweils in der Haut, den Gelenken und dem Immunsystem eine wichtige Rolle spielen.

Die kultivierten Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Apremilast behandelt, um zunächst die Genexpression antimikrobieller und antiviraler Gene in Keratinozyten und Synoviozyten mittels qPCR zu untersuchen. Bei CD4⁺-T-Zellen wurde anhand der Genexpressionsanalyse ermittelt, wie sich Apremilast auf die T-Zell-Differenzierung auswirkt. Zusätzlich wurde mithilfe der Durchflusszytometrie die Proteinsekretion von IL-17 und IL-26 von CD4⁺-T-Zellen nach Apremilast-Behandlung analysiert. Des Weiteren wurde der Einfluss von Apremilast auf die Lymphozyten-Aktivierung untersucht und zuletzt ein Interferon-Gamma-Release-Assay durchgeführt, mit dem sezerniertes IFN- γ von T-Zellen gemessen wurde.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass Apremilast die antimikrobielle und antivirale Abwehr in den getesteten Zellen nicht beeinflusst. Es

besteht daher noch weiterer Forschungsbedarf, um die Mechanismen, die zu den beobachteten Nebenwirkungen führen, zu entschlüsseln.

Summary

Psoriasis is a chronic inflammatory autoimmune skin disease that becomes manifest in visible red plaques on the skin. About 2 to 3 % of the population are affected by it. The disease significantly reduces the quality of life and is attended by various other illnesses, especially psoriatic arthritis (PsA) which, in the beginning, typically affects the small joints. Psoriasis and psoriatic arthritis alike are influenced by a variety of inflammatory mediators, such as tumour necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-17 or IL-22. Apremilast, an active agent to be taken orally, is one of the available treatments for psoriasis and psoriatic arthritis. It selectively inhibits phosphodiesterase (PDE4) which leads to a reduced transcription of pro-inflammatory cytokines like TNF- α and IFN- γ while at the same time the transcription of anti-inflammatory cytokines like IL-10 is increased. Despite the generally high tolerability of Apremilast, upper respiratory infections have been observed as side effects of the therapy.

In light of these infectious side-effects, this work investigates the impact of Apremilast on the antimicrobial and antiviral defence of keratinocytes, synoviocytes and T cells, which play a crucial role inside the skin, joints and the immune system, respectively.

The cultivated cells were treated with Apremilast under diverse conditions, primarily to analyse the gene expression of antimicrobial and antiviral genes of keratinocytes and synoviocytes via qPCR. By means of gene expression analysis on CD4+ T cells, the effect of Apremilast on T cell differentiation was determined. Furthermore, CD4+ T cell protein secretion of IL-17 and IL-26 after Apremilast treatment was analysed using flow cytometry. The effect of Apremilast on lymphocyte activation was also examined. Lastly, an interferon gamma release assay was conducted to measure secreted IFN- γ from T cells.

In sum, the results indicate that Apremilast does not affect the antimicrobial and antiviral defence of the tested cells. Further research is thus required to uncover the mechanisms that cause the observed side effects.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius (0°C = 273,15 Kelvin)
A0,5	Apremilast (0,5 µM)
A2	Apremilast (2 µM)
AB	<i>Antibody</i> , Antikörper
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
ALP	Antileukoprotease
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP	Antimikrobielle Peptide
AOD	<i>Assay-on-Demand</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
Aprem	Apremilast
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Antivirales Peptid
β-ME	β-Mercaptoethanol
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAMP	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i> , alternativ LL37 oder hCAP
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonuclein Acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP10	<i>10 kDa culture filtrate protein</i> , sezerniert von <i>M. tuberculosis</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat

cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstructive Lungenerkrankung
CPT	<i>Cell-Preparation Tubes</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DC	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	<i>Double-stranded Ribonuclein Acid</i> , Doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i> , gramnegatives, säurebildendes und peritrich begeißeltes Bakterium
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESAT6	<i>6 kDa early secreted antigenic target</i> , sezerniert von <i>M. tuberculosis</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> , „und andere“
etc.	<i>et cetera</i> , „und die übrigen“
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>

Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GATA3	Transkriptionsfaktor für T _H 2-Zellen
GD	<i>Green Diluent</i>
gE	<i>Envelope glycoprotein E</i> , Oberflächenprotein des Varizella-Zoster-Virus
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	G-Protein, Proteine, die Guanin-Nukleotide binden
h	Stunde
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes</i> , langlebige, immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie
HARBS	<i>High-affinity rolipram binding site</i>
hBD	Humanes Betadefensin
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HD	<i>Human Defensin</i>
HFLS	<i>Human Fibroblast-like Synoviocyte</i>
HNP	<i>Human Neutrophile Peptide</i>
IE	Internationale Einheit
IE63	<i>Immediate-Early 63 Protein</i> , Latenzprotein des Varizella-Zoster-Virus
IFN	Interferon
IFNAR	IFN- α -Rezeptorgen
IFNGR	IFN- γ -Rezeptorgen

IFNLR	IFN- λ -Rezeptorgen
Ig	Immunglobulin
IGRA	<i>Interferon-Gamma-Release-Assay</i> (QuantiFERON [®] Test, Qiagen)
IL	Interleukin
ISG	<i>Interferon-stimulated gene</i>
JAK	Janus-Tyrosinkinase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
LAM	Lipoarabinomannan von <i>M. tuberculosis</i>
LARBS	<i>Low-affinity rolipram binding site</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LTA	<i>Lipoteichonic acid</i> , Lipoteichonsäure
M	Medium
m ²	Quadratmeter
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
μ M	Mikromolar

µm	Mikrometer
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MPS	Mononukleär-phagozytäres System
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MX	Myxovirus
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Na ₂ -EDTA	Natrium-EDTA
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PK	Proteinkinase
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> , Mustererkennungsrezeptoren

PsA	Psoriasis-Arthritis
qPCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RE	Relative Einheit
rEGF	<i>Recombinant Epidermal Growth Factor</i>
RF	Rheumafaktor
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
SFM	<i>Serum-free medium</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TB	Tuberkulose
T-bet	<i>T-box-expressed in T-cells</i> , Transkriptionsfaktor für T _H 1-Zellen
TCR	T cell receptor, T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle

UV	Ultraviolett
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Haut.....	1
1.1.1 Epidermis.....	1
1.1.2 Dermis	2
1.1.3 Subkutis.....	2
1.1.4 Funktion.....	3
1.2 Gelenke	3
1.2.1 Gelenkkörper.....	4
1.2.2 Gelenkkapsel	4
1.3 Blut.....	5
1.4 Antimikrobielle Peptide.....	10
1.5 Antivirale Peptide.....	12
1.6 Erkrankungen der Haut und des Gelenks.....	14
1.6.1 Psoriasis.....	14
1.6.2 Psoriasis-Arthritis	15
1.7 Apremilast.....	16
1.7.1 Phosphodiesterasen und ihre Inhibition.....	17
1.7.2 Nebenwirkungen.....	19
1.8 Ziele der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Humane Proben	21
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Keratinozyten	21
2.2.2 Synoviozyten	24
2.2.3 T-Zellen.....	26
2.3 Zellvitalitätsassays.....	29
2.3.1 MTT-Assay für Keratinozyten	29
2.3.2 CellTiter-Glo® für Synoviozyten und T-Zellen	29
2.4 RNA-Isolation.....	31
2.4.1 Durchführung	31

2.4.2	Messung der RNA-Konzentration.....	32
2.5	cDNA-Synthese/ <i>reverse transcriptase</i> PCR	32
2.5.1	Prinzip.....	32
2.5.2	Durchführung	33
2.6	qPCR - quantitative Echtzeit-PCR	35
2.6.1	Einleitung.....	35
2.6.2	TaqMan® <i>real-time</i> PCR	36
2.6.3	SYBR® Green-Primer	38
2.6.4	Primersequenzen/Referenznummern	38
2.7	Durchflusszytometrie der T-Zellen	39
2.8	Lymphozyten-Stimulation mit Varizellen-Antigen	40
2.8.1	Oberflächenmolekül CD69	40
2.8.2	Lymphozyten-Stimulation	41
2.8.3	Durchflusszytometrie der Varizella-Antigen-stimulierten Lymphozyten.....	41
2.9	Interferon-gamma-release-assay	42
2.9.1	Standardprinzip	42
2.9.2	Durchführung	42
2.10	Auswertung und Statistik	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Apremilast hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen.....	45
3.2	Effekte von Apremilast auf die antimikrobielle Abwehr von Keratinozyten- und Synoviozytenzellkulturen	46
3.2.1	Apremilast hat keinen Einfluss auf die Expression von AMP in Keratinozyten.....	47
3.2.2	Apremilast hat keinen Einfluss auf die Expression von AMP in Synoviozyten	49
3.3	Effekt von Apremilast auf antivirale Peptide in Keratinozyten und Synoviozyten	52
3.3.1	Apremilast beeinflusst die Expression von AVP in Keratinozyten nicht.....	52
3.3.2	Apremilast beeinflusst die Expression von AVP in Synoviozyten nicht.....	54
3.4	Auswirkung von Apremilast auf die Differenzierung von T-Zellen.....	56
3.5	Effekte von T-Zell-Überständen auf Keratinozyten und Synoviozyten	58
3.5.1	Leichte Induktion von <i>S100A7</i> in Keratinozyten durch T-Zell-Überstand	59
3.5.2	Überstände von Apremilast-behandelten T-Zellen reduzieren AVP Genexpression in Synoviozyten.....	60
3.6	Apremilast aktiviert Lymphozyten	61
3.7	Apremilast hat keinen Einfluss auf die IFN- γ Sekretion in Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose	63

4	Diskussion.....	65
4.1	Effekte des Apremilast auf AMP und AVP in Keratinozyten	66
4.2	Effekte des Apremilast auf AMP und AVP in Synoviozyten.....	68
4.3	Auswirkungen von Apremilast auf T-Zell-Differenzierung	69
4.4	AMP- und AVP-Expression in Keratinozyten und Synoviozyten nach Behandlung mit T-Zell-Überständen.....	71
4.5	Einfluss des Apremilast auf die Lymphozyten-Aktivierung	72
4.6	Effekt des Apremilast auf die IFN- γ -Sekretion in Blut.....	72
4.7	Weitere Überlegungen.....	72
4.8	Fazit/Schlussfolgerung	76
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	77
5.1	Abbildungsverzeichnis.....	80
5.2	Tabellenverzeichnis.....	81
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Bei einem durchschnittlichen Menschen nimmt die Haut eine Fläche von 1,5 bis 2 m² ein und kann je nach Beanspruchung eine unterschiedliche Dicke erreichen. [1, 2] Dementsprechend kann sie ein Gewicht von 3 bis 10 kg haben. [1] Neben der Schutzfunktion nach Innen und Außen, wozu z. B. Schutz vor Hitze/Kälte, UV-Strahlung, mechanischen und chemischen Reizen und auch Keimen und Allergenen gehören, hat die Haut noch zahlreiche weitere Aufgaben. [1] Grundsätzlich besteht die Haut aus drei Schichten. [1] Es handelt sich von außen nach innen um die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut). [1]

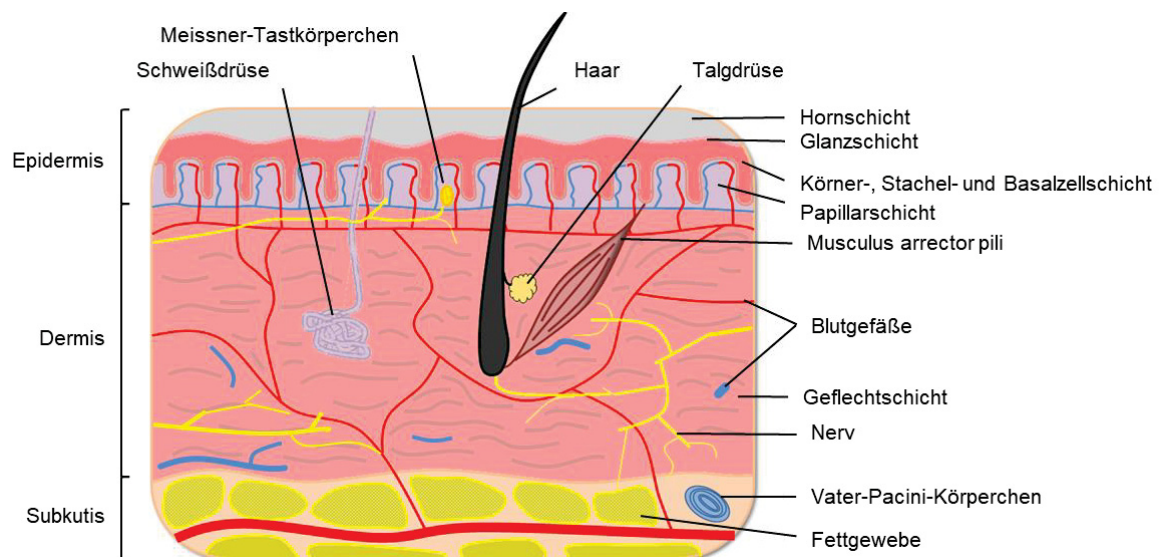


Abb. 1: Aufbau der Haut. Zu sehen sind die drei Schichten der Haut (Epidermis, Dermis und Subkutis) mit ihren Bestandteilen. (Mit Genehmigung durch Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart - New York - I care Pflege – 2005)

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis als äußerste der drei Hautschichten besteht aus einem festen Zellverbund, besitzt keine Blutgefäße und dient in erster Linie zum Schutz und als Barriere gegen Keime und Fremdstoffe. [3] Die Dicke dieser Hautschicht ist stark von mechanischer Beanspruchung abhängig. [3] Je größer die Belastung ist, desto dicker ist die Epidermis. Histologisch handelt es sich um ein mehrschichtig

verhornendes Plattenepithel, bestehend aus mehreren Schichten, die primär aus Keratinozyten gebildet sind. [1] Diese Schichten der Epidermis können wiederum aufgeteilt werden. Das Stratum corneum stellt die oberflächliche absolut äußerste Hornschicht dar. [1] Die Keratinozyten werden hier durch Desmosomen verbunden. [3] Die Zellen werden nach außen immer flacher, besitzen keinen Zellkern mehr, verhornen zur Oberfläche hin immer weiter und lösen sich letztendlich. [2] An das Stratum corneum schließen sich nach innen hin das Stratum granulosum und das Stratum spinosum an, die aus unverhornten Zellen bestehen, darunter befindet sich das Stratum basale. [1] Beim Stratum basale handelt es sich um eine einzellige Schicht, wo die Zellvermehrung der Haut stattfindet. [1] In dieser untersten Schicht und dem darüber liegenden Stratum spinosum sind die Melanozyten lokalisiert, die durch Melaninproduktion für die Pigmentierung der Haut sorgen. [1]

1.1.2 Dermis

Unter der Epidermis befindet sich die Dermis. Es handelt sich um eine aus Bindegewebsfasern bestehende Hautschicht, die in das an die Epidermis grenzende Stratum papillare und das Stratum reticulare unterteilt wird. [2] Die zapfenartige Form des Stratum papillare ermöglicht einen besonders stabilen Verbund zwischen Dermis und der darüber liegenden Epidermis. [2] Eine hohe mechanische Belastung ist möglich und zusätzlich wird durch diese Kontaktflächenvergrößerung die Nährstoffversorgung der Epidermis verbessert. [2] Kapillaren und sensorische Zellen zur Wahrnehmung des Tast- und Wärmeempfindens sind hier lokalisiert. [2] In dem aus dickeren elastischen Fasern bestehenden Stratum reticulare befinden sich Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen, Blut- und Lymphgefäße und Nerven. [1]

1.1.3 Subkutis

Die Subkutis als unterste der drei Hautschichten besteht aus mit Fettzellen gefüllten Bindegewebskammern. [1] Der Gehalt an Fettzellen ist individuell verschieden und ist unter anderem zusätzlich abhängig von Geschlecht, Konstitution und hormonellen Schwankungen. [3] Bindegewebszüge ziehen sich von der Dermis

durch die Subkutis bis in das darunter liegende Gewebe und sorgen für einen sehr starken Verbund der verschiedenen Strukturen. [3]

1.1.4 Funktion

Nach außen hin schützt die Haut den Körper durch Absonderung fetthaltiger Substanzen vor Wasserverlust und durch den festen Zellverbund dient sie als Barriere vor Keimen und schädlichen Stoffen. [2] Der von den Schweißdrüsen produzierte Schweiß enthält antimikrobielle Substanzen und bildet mit seinem sauren pH-Wert den Säureschutzmantel der Haut. In gewissem Maße bietet die Haut einen mechanischen Schutz für die inneren Strukturen. [2] UV-Strahlung wird zu einem Teil an den Hornschichten reflektiert und absorbiert. Tiefer eindringende Strahlen werden nahezu zu 100 % von den Melaninpigmenten absorbiert. [2] Die Schutzfunktion der Haut nach innen bezieht sich auf das Abwehrsystem. Bei Aktivierung werden Antikörper gebildet, es kommt zu vermehrter Durchblutung und den typischen Anzeichen einer Entzündung (Rubor, Calor, Dolor, Tumor und Functio laesa). [2]

1.2 Gelenke

Gelenke verbinden die einzelnen Knochen miteinander und werden demnach auch diskontinuierliche Knochenverbindungen genannt. Stabilisiert und bewegt werden sie durch Sehnen, Bänder und Muskeln. Das Gelenk selbst besteht aus einem Gelenkkörper, einer Gelenkkapsel, dem Gelenkspalt und der Synovialflüssigkeit (Gelenkschmiere) (Abb. 2). [4]

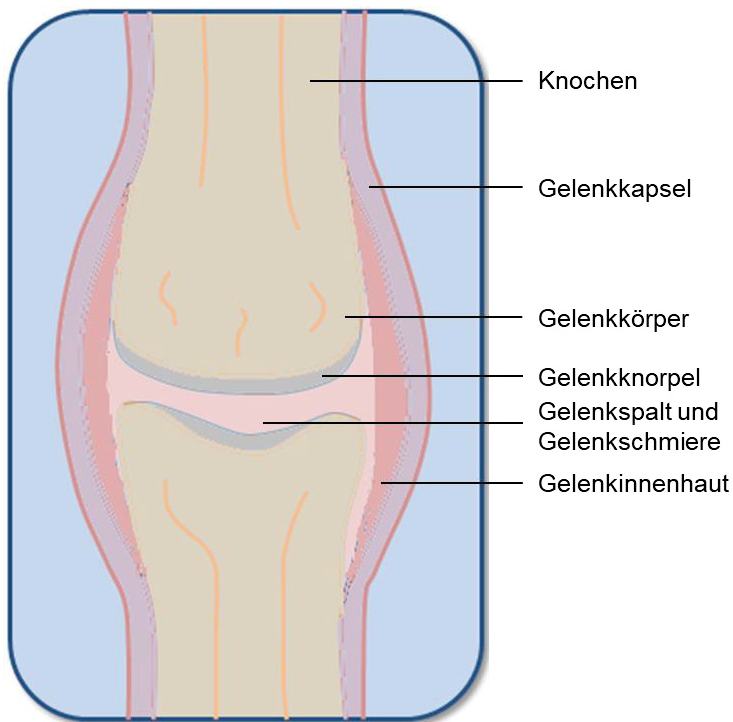


Abb. 2: Aufbau des Gelenks. Dargestellt sind die beiden Gelenkkörper umhüllt von der Gelenkkapsel und getrennt durch den Gelenkspalt. (Eigene Zeichnung)

1.2.1 Gelenkkörper

Gebildet wird ein Gelenk aus mindestens zwei Gelenkkörpern, die vom Gelenkknorpel bedeckt sind. Dieser besteht meistens aus hyalinem Knorpel, jedoch gibt es selten auch Überkleidungen aus Faserknorpel oder Bindegewebe mit Faserknorpel einlagerungen. Der Knorpel ist mit dem darunter liegenden Knochen fest verbunden. Die Dicke der Knorpelschicht ist durchschnittlich 2 bis 5 mm. Da der Knorpel keine Gefäße besitzt, erfolgt die Ernährung über die Gelenkflüssigkeit. Die Aufgabe des Knorpels besteht darin, eine glatte Oberfläche zu schaffen und somit die Reibung im Gelenk zu minimieren. [4]

1.2.2 Gelenkkapsel

Umgeben ist das Gelenk von der bindegewebigen Gelenkkapsel. Sie besteht aus einer äußeren Faserschicht, der Membrana fibrosa, und einer inneren Schicht, der Membrana synovialis. Die Membrana fibrosa ist derbe und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I. Die Funktion besteht darin, das Gelenk zu stabilisieren und zu schützen. Die Faserdicke ist variabel und wird teilweise durch Bänder verstärkt. [4]

Die Membrana synovialis als innere Faserschicht enthält weniger und lockerere Fasern als die Außenhaut. [4] Die sonst sich überlappenden Fibrozyten bilden hier eine synoviale Deckschicht aus Synovialzellen (Synoviozyten). [5] Diese sind flächenhaft in einem ein- oder mehrschichtigen Epithel ausgebreitet. [5] Die Synoviozyten produzieren außerdem die Synovialflüssigkeit, auch Gelenkschmiere genannt, die in den Gelenkspalt abgegeben wird und von den Synoviozyten auch wieder resorbiert werden kann. Es handelt sich um eine zähe, farblose Flüssigkeit, die bei Bewegung dünnflüssiger wird. [4] Neben der Funktion, die im Gelenk stattfindende Reibung abzumildern, dient die Synovialflüssigkeit dem Transport von Glukose und damit der Ernährung des gefäßlosen Gelenkknorpels. [4]

1.3 Blut

Blut besteht aus einer zellulären Komponente und dem Blutplasma, einer gelblichen Flüssigkeit aus Wasser und verschiedenen Eiweißen. [6] Der menschliche Organismus hat durchschnittlich ein Gesamtvolumen von 4 bis 6 Liter Blut. [6] Das Blut als Transport- und Kommunikationsorgan erfüllt vielfältige Funktionen. Zu den Aufgaben zählen Nährstoffversorgung der Organe, der Transport verschiedener Substanzen, die Wärmeregulation, die Abwehr krankheitserregender Keime und die Blutstillung nach Verletzungen. [7] Der zelluläre Anteil des Blutes, auch Hämatokrit genannt, macht etwa 40 bis 50 % des Gesamtvolumens aus. [6] Man unterscheidet drei Zelltypen, die Erythrozyten, die Thrombozyten und die Leukozyten. [6] Im Folgenden wird jedoch nur auf die Leukozyten näher eingegangen.

Leukozyten

Den zahlenmäßig kleinsten Teil nehmen die Leukozyten, also die weißen Blutkörperchen, mit $0,04$ bis $0,11 \cdot 10^5$ Zellen pro μl Blut ein. [6] Das ist ca. 1 % der Gesamtzellzahl im Blut. Leukozyten sind die kernhaltigen Zellen des Blutes und ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems. Sie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen; zum einen in die Phagozyten, die als Zellen der angeborenen Immunabwehr gelten, und zum anderen in die Lymphozyten, die zur erworbenen Immunabwehr zählen. [6]

Phagozyten lassen sich wiederum in Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen einteilen. Die Granulozyten lassen sich abermals in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilen. [6] Die neutrophilen Granulozyten spielen eine wichtige Rolle in der Erstbekämpfung von Krankheitserregern. Sie phagozytieren diese und bauen sie ab. Zu diesem Zweck können neutrophile Granulozyten auch ins Gewebe migrieren. [6] Eosinophile Granulozyten haben als Hauptaufgabe die Bekämpfung von Parasiten durch Exozytose toxischer Proteine, die zur Zellschädigung führen. [6] Die zweite Phagozyten-Gruppe sind die Monozyten. Sie sind die größten Zellen des Blutes (20 µm) und befinden sich nur ein bis drei Tage im Blut, bevor sie zugrunde gehen oder den Blutkreislauf verlassen, um sich zu gewebetypischen Makrophagen zu differenzieren. [6] Sie dienen der unspezifischen Abwehr und haben auch die Aufgabe Fremd- und Schadstoffe zu phagozytieren und so zu beseitigen. [6] Zuletzt werden die dendritischen Zellen (DCs) zu den Phagozyten gezählt. Sie stellen die wichtigsten Zellen für die Antigen-Präsentation dar. [6] Sie produzieren als Reaktion auf eine Infektion große Mengen an Zytokinen und aktivieren die T-Lymphozyten. [6]

Die zweite große Komponente der Leukozyten bilden die Lymphozyten. Es gibt die B- und T-Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen. [6, 8] Natürliche Killerzellen gehören zum angeborenen Immunsystem und können sowohl Antikörper-vermittelte, als auch nicht-Antikörper-vermittelte Zytotoxizität zeigen. [6] Sie dienen vor allem dem Vernichten virusinfizierter Zellen und Tumorzellen. [6]

B-Lymphozyten entstehen im Knochenmark und sind zunächst inaktiv. Ihre B-Zell-Rezeptoren sind membrangebundene Immunglobuline der Klasse M (IgM). [9] Kommt es zu Antigen-Kontakt mit einem passenden Antigen, was durch Antigenpräsentation über follikuläre dendritische Zellen oder durch Interleukine von aktivierten T-Lymphozyten erfolgen kann, werden die B-Zellen aktiviert. [9]

T-Lymphozyten entstehen wie alle Blutzellen im Knochenmark und wandern von dort aus in den Thymus. [8] Dort bilden sie den charakteristischen Oberflächenmarker *Cluster of Differentiation* (CD)3 sowie antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf ihrer Zelloberfläche aus. [6, 8] Es bleiben nur Zellen erhalten, die körperfremde Antigene erkennen können, was ungefähr ein bis zwei Prozent der T-Zellen ausmacht. [8] T-Zellen können Antigene jedoch nur dann erkennen, wenn

diese ihnen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC), zum Beispiel die oben beschriebenen dendritischen Zellen, mittels MHC-Komplexes präsentiert werden. [6] Man unterscheidet CD4- und CD8-positive T-Zellen. [6] CD4 wird von T-Helferzellen exprimiert, wohingegen zytotoxische T-Zellen CD8 exprimieren und so CD8-positiv sind. [8]

CD4⁺-T-Zellen

CD4⁺-T-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt. [8] Sie erkennen die von Antigen-präsentierenden Zellen dargestellten Antigene und rufen dann eine Immunreaktion hervor. [8] Zu den Aufgaben gehören die Induktion der Antikörpersynthese, Entscheidung über den Klassenwechsel bei den Immunglobulinen, Aktivierung oder Inaktivierung von Makrophagen, Verstärkung der NK-Zell-Zytotoxizität, Verstärkung oder Hemmung der Lymphozyten-proliferation. [8] Diese Aufgaben funktionieren, indem die T-Helfer-Zellen nach Antigen-Erkennung Zytokine ausschütten und dadurch andere Zellen wie Makrophagen, zytotoxische T-Zellen oder B-Lymphozyten aktivieren. [8] Um die beschriebenen Immunreaktionen auszulösen, müssen die T-Helferzellen aktiviert werden, wofür drei Signale benötigt werden. [10] Der erste Aktivierungsschritt ist die Antigenpräsentation über Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC)-II-Moleküle durch APCs (Signal 1). [10] Zusätzlich benötigen die T-Helferzellen für ihre Aktivierung ko-stimulierende Signale über einen ihrer zahlreichen Rezeptoren (Signal 2). [10] Zu diesen ko-stimulierenden Signalen gehört das CD28, das die T-Zellen selber exprimieren. [10] Es bindet an CD80 oder CD86 (ko-stimulierende Liganden) von APCs. [10] Die ko-stimulierenden Liganden werden von den APCs nur dann in ausreichender Menge exprimiert, wenn T-Helferzellen aktiviert werden sollen. [10] Als letztes Signal (Signal 3) bestimmen unterschiedliche Zytokine, welche T-Zell-Subpopulation entsteht. [10]

Man unterscheidet verschiedene CD4-T-Zell-Subgruppen, unter anderem die T-Helferzelle (T_H)1-, die T_H2-, und die T_H17-Zellen sowie die T_{reg}-Zelle (regulatorische T-Zelle) (Abb. 3). [8]

T_H1-Zellen bedingen eine starke proinflammatorische, zelluläre Immunantwort und zytotoxische Immunglobuline (Typ: IgG). [8] Für die Entstehung von T_H1-Zellen

müssen IFN- γ und IL-12 vorliegen. [8] IL-12 wird von dendritischen Zellen produziert, wenn diese durch bakterielle Substanzen (z. B. LPS) und virale Komponenten (dsRNA) aktiviert werden. [8] Auch Makrophagen synthetisieren IL-12, nachdem diese durch Infektion direkt oder durch IFN- γ von NK-Zellen aktiviert worden sind. [8] Der typische Transkriptionsfaktor für T_H1-Zellen ist t-bet. [11] Typische Zytokine, die von T_H1-Zellen sekretiert werden, sind IFN- γ , IL-2 und TNF- β . [6]

Die Gegenwart von IL-4 lässt T_H2-Zellen entstehen. [8] IL-4 wird von dendritischen Zellen produziert, unter anderem nach parasitärem Befall. [8] IL-4 ist auch das Leitzytokin der T_H2-Zellen. [8] T_H2-Zellen selbst schütten IL-10, IL-5 und IL-13, als auch IL-4 aus. [9] Durch die Sekretion von IL-5 kommt es zur Aktivierung eosinophiler Granulozyten. [9] IL-10, IL-4 und IL-13 wirken hemmend auf die Makrophagenaktivität und schwächen hierdurch mit die T_H1-Zell-Antwort. [9] Zusätzlich wirken die von T_H2-Zellen gebildeten Zytokine antagonistisch zu dem von T_H1-Zellen gebildeten IFN- γ . [9]

Ein weiterer Subtyp der T-Helferzellen ist die T_H17-Zelle. T_H17-Zellen wirken besonders auf Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, z. B. Keratinozyten oder Synoviozyten. [8] Für ihre Differenzierung werden IL-6, IL-23 und TGF- β benötigt. [8] Der charakteristische Transkriptionsfaktor ist zudem ROR γ t. [11] T_H17-Zellen produzieren hauptsächlich die Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-26. [10] Zu den Funktionen der T_H17-Zellen gehört die Förderung der Gewebeentzündung durch Anregung von Fibroblasten, Endothelzellen oder Epithelzellen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. [8] Deshalb haben T_H17-Zellen eine besondere Stellung in der antibakteriellen Abwehr, weil sie durch die Zytokine neutrophile Granulozyten anlocken und aktivieren. [8] T_H17-Zellen besitzen eine sehr hohe Plastizität. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit eines Typenwechsels, sodass unter bestimmten Bedingungen aus T_H17-Zellen unter anderem T_H1-Zellen werden können. [10] Weiterhin scheinen je nach Zytokinmilieu entweder „klassische“ oder „alternative“ T_H17-Zellen zu entstehen. [11] Hier haben Untersuchungen ergeben, dass das Zusammenspiel von IL-23 und TGF- β zu „klassischen“ T_H17-Zellen führt, IL-23 alleine hingegen „alternative“ T_H17-Zellen entstehen lässt. [11] Im Gegensatz zu „klassischen“ T_H17-Zellen exprimieren „alternative“ T_H17-Zellen das pro-entzündliche Zytokin IFN- γ und den

Transkriptionsfaktor Luc, der normalerweise den T_H1-Zellen zugeordnet ist. [11] Das TGF-β, was bei den „klassischen“ T_H17-Zellen beteiligt ist, inhibiert hingegen die IFN-γ- und T-bet-Produktion. [11] Die „alternativen“ T_H17-Zellen werden dementsprechend auch als „pathogene“ T_H17-Zellen bezeichnet. [11] So ist das IL-10, was einige antiinflammatorische Funktionen besitzt, in den „alternativen“ T_H17-Zellen herunterreguliert und das zur Pathogenität führende GM-CSF wird von „alternativen“ T_H17-Zellen vermehrt exprimiert. [11]

T_{reg}-Zellen dienen der Hemmung von Immunantworten. [10] Sie üben ihre Funktionen durch unterschiedliche Mechanismen wie die Expression immunsuppressiver Zytokine (z. B. IL-10 oder transformierender Wachstumsfaktor β (engl.: *transforming growth factor* β, TGF-β)) oder durch Aufnahme des Wachstumsfaktors IL-2, der das Überleben aktivierter T-Zellen sichert, aus. [10] Zudem können sie auf Antigen-präsentierende Zellen einwirken, dass es zum Verlust der Fähigkeit für die T-Zell-Aktivierung kommt. [10]

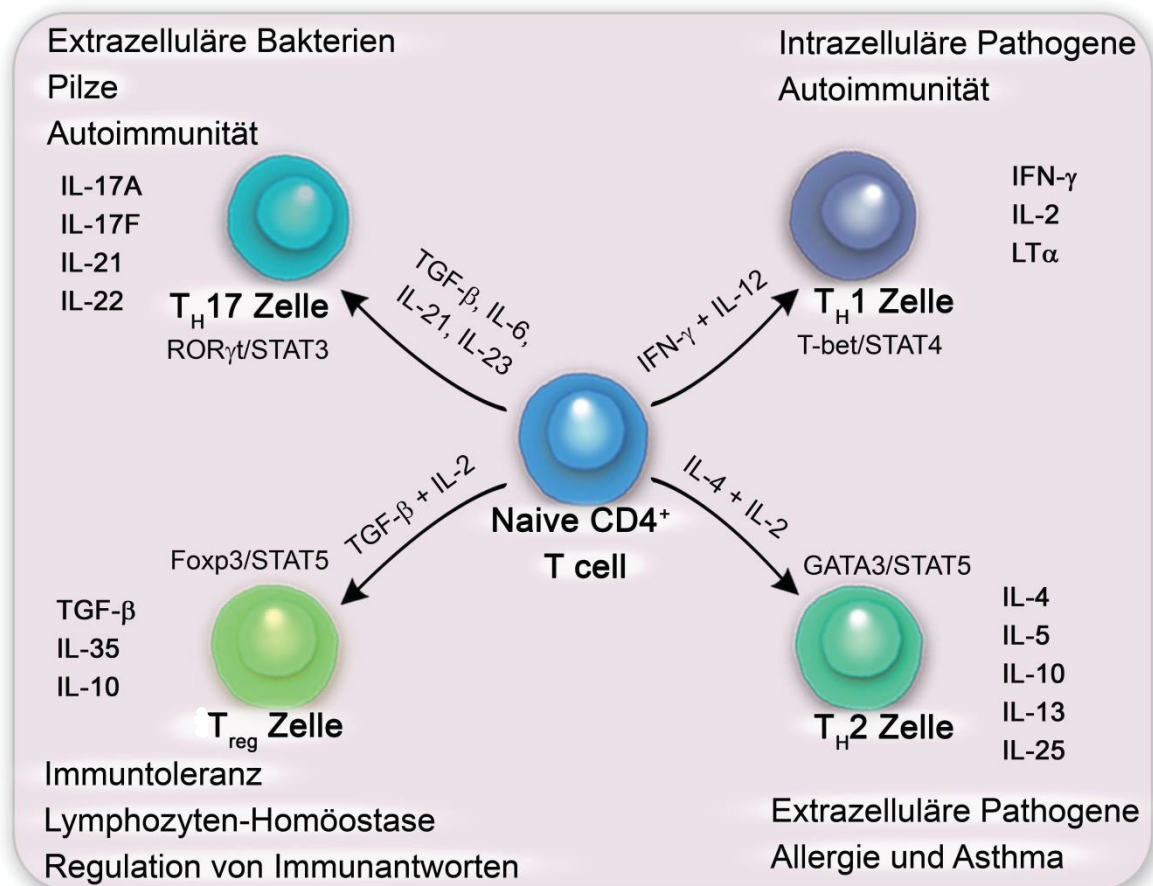


Abb. 3: T-Zell-Differenzierung aus naiven CD4⁺-T-Zellen. Aus naiven CD4⁺-T-Zellen können sich mithilfe verschiedener Stimulanzen und Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Subtypen differenzieren. Durch IFN-γ und IL-12 sowie die Transkriptionsfaktoren T-bet und STAT4 entstehen TH1-Zellen, die IFN-γ, IL-2 und LTα synthetisieren; durch IL-4 und IL-2 sowie die Transkriptionsfaktoren GATA3 und STAT5 entstehen TH2-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-25 synthetisieren; durch TGF-β, IL-6, IL-21 und IL-23 sowie die Transkriptionsfaktoren RORγt und STAT3 entstehen TH17-Zellen, die unter anderem IL-17A, IL-17F und IL-22 synthetisieren; durch TGF-β und IL-2 sowie die Transkriptionsfaktoren Foxp3 und STAT5 entstehen Treg-Zellen, die TGF-β, IL-35 und IL-10 synthetisieren. Die TH1-Zellen sind bei intrazellulären Pathogenen und Autoimmunität involviert, die TH2-Zellen bei extrazellulären Pathogenen, Allergie und Asthma, die TH17-Zellen bei extrazellulären Bakterien, Pilzen und Autoimmunität und die Treg-Zellen spielen bei Immuntoleranz, Lymphozyten-Homöostase und der Regulation von Immunantworten eine Rolle. Darstellung modifiziert nach: Zhu. 2008 [12]

1.4 Antimikrobielle Peptide

Bei der unspezifischen Abwehr des menschlichen Immunsystems spielen Sekretionsprodukte von Leukozyten und Epithelzellen, aber auch antimikrobielle Peptide (AMP) eine bedeutende Rolle. [13] AMP sind humorale Faktoren des unspezifischen Immunsystems. [13] Ihre Größe beschränkt sich normalerweise auf eine Länge von weniger als 100 Aminosäuren, die von individuellen Genen kodiert werden. Eingeteilt werden AMP anhand ihrer Struktur. Beim Menschen kommen Peptide der Defensin-, der Cathelicidin- und der Histatinfamilie vor, die einige

Gemeinsamkeiten aufweisen. Alle AMP besitzen eine positive Nettoladung bei neutralem pH-Wert, die durch das Vorkommen der kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin zustande kommt. Außerdem haben sie eine hydrophobe und eine hydrophile Seite der dreidimensionalen Peptidstruktur (eine sogenannte amphipathische Struktur), was unter anderem für den Wirkmechanismus relevant ist. [14] Bei physiologischem pH-Wert sind wie oben erwähnt die meisten AMP positiv geladen, sodass sie mit negativen Ladungen der Oberflächen von Mikroorganismen interagieren können. Der Hauptwirkmechanismus funktioniert wie folgt: Durch ihre amphiphile Eigenschaft lagern sich die AMP in die Membran der Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilzen ein und führen z. B. durch Porenbildung zur Zerstörung dieser. [14] Für die Haut sind AMP entsprechend von wesentlicher Bedeutung, um ihrer Funktion als Barriere vor eindringenden Mikroorganismen gerecht zu werden. Zu spezifischen AMP in der Haut gehören Lysozym, der sekretorische Leukoprotease-Inhibitor oder Antileukoprotease (ALP), RNase 7 und Dermcidin, [15] genauso wie Defensine, Cathelicidine und S100-Proteine.

Defensine sind kleine kationische Peptidmoleküle, die reich an Cystein sind. [13] Charakteristisch sind drei intramolekulare Disulfidbrücken und hauptsächlich eine β -Faltblattstruktur. Sie kommen beim Menschen in einer α - und einer β -Variante vor, die sich in den Disulfidbrücken unterscheiden. [14] Produzenten für Defensine sind unter anderem Makrophagen und Granulozyten sowie Epithelien der Haut, des Mundes und des Gastrointestinaltraktes. [13] α -Defensine sind zwischen 29 und 35 Aminosäuren lang und besitzen eine dreisträngige β -Faltblattstruktur. Es gibt sechs verschiedene Vertreter: *Human Neutrophil Peptide* 1 bis 4 (HNP 1 bis 4), die sich hauptsächlich in den Granula der neutrophilen Granulozyten befinden, sowie *Human Defensin* 5 und 6 (HD-5 und HD-6), die fast ausschließlich von den Paneth-Zellen der Darmmukosa gebildet werden. [14] β -Defensine sind mit 36 bis 42 Aminosäuren etwas länger als die α -Defensine. [14] Von humanen β -Defensinen gibt es vier (hBD1 bis 4). [16] Sie werden von epithelialen Zellen beispielsweise im Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationstrakt produziert. [16] hBD-1 ist ein Peptid, das kontinuierlich gebildet wird, während die Produktion von hBD-2, hBD-3 und hBD-4 induzierbar ist und durch inflammatorische Mediatoren stimuliert wird. [16]

Cathelizidine gehören ebenfalls zu den antimikrobiellen Peptiden. LL-37, auch *Human Cationic Antimicrobial Peptide* (hCAP-18) oder *Cathelicidine Antimicrobial Peptide* (CAMP) genannt, ist der einzige Vertreter dieser Gruppe im Menschen. Es kommt sowohl in neutrophilen Granulozyten als auch auf Körperoberflächen vor. Im Respirationstrakt wird es von den gleichen Zelltypen produziert, die auch die β -Defensine produzieren. Die Cathelizidine werden intrazellulär gespeichert und durch Endoproteolyse aktiviert, nachdem sie sezerniert worden sind. [14] Die Expression von AMP (z. B. LL-37) wird von Zytokinen (z. B. IL-17) induziert. [17]

Bei den Vertretern der S100-Familie handelt es sich um kleine Kalzium-bindende Proteine, die in großer Menge in neutrophilen Granulozyten und Monozyten vorkommen. Während einer Entzündung sind sie jedoch ebenso im Extrazellulärraum anzutreffen. [18] Dem S100-Protein Psoriasin (S100A7) wird insbesondere in Bezug auf *Escherichia coli* (E. coli) antimikrobielle Aktivität zugeschrieben. [19] Auch die S100-Proteine S100A8 und S100A9 wirken antimikrobiell und durch die chemotaktische Aktivierung neutrophiler Granulozyten proinflammatorisch. [18]

1.5 Antivirale Peptide

Neben Peptiden mit einer antimikrobiellen Wirkung - den AMP, gibt es auch Peptide mit antiviralen Eigenschaften, die antiviralen Peptide (AVP). Diese wurden vor allem bei Psoriasis-Patienten gehäuft in der Haut nachgewiesen. [20] Bekannte AVP sind beispielsweise *IFN-stimulated gene 15* (ISG15), *Myxovirus resistance 1* (MX1), Ribonuclease L (RNase L) und Proteinkinase R (PKR). [21] Studien zeigten, dass vier Haupteffektor-Signalwege Interferon-vermittelter antiviraler Antwort zu unterscheiden sind: der ISG15-*Ubiquitin-like*-Signalweg, der Proteinkinase R-Signalweg, der 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase/Ribonuclease L-Signalweg und der MX-GTPase-Signalweg. [21] Diese verschiedenen Signalwege blockieren virale Transkription, degradieren virale RNA, hemmen die Translation und modifizieren Protein-Funktion, um alle Schritte der viralen Replikation zu kontrollieren. [21]

Das erste beschriebene antivirale Peptid des ISG15-*Ubiquitin-like*-Signalwegs ist ISG15, welches ein Molekulargewicht von 15 kDa hat [21] und das nach viraler Infektion durch Interferon-stimulierte Gene (ISGs) induziert wird. [22] Zusammen mit

Ubiquitin ist es in einen Vorgang namens *ISGylation* involviert, in dem es durch die drei Enzyme E1 (*activating protein Ube1L*), E2 (*conjugating enzyme Ubch8*) und E3 (*ligase CEB1*) am C-Terminus des ISG15 zur Konjugation mit diversen zellulären oder viralen Proteinen kommt. [22] Durch diese Bindung kann unter anderem die Funktion der Proteine verändert werden. [22] Es gibt ISG15 folglich in drei Formen: als freies, ungebundenes intrazelluläres Protein, als ISG15 gebunden an Virus- und/oder Wirts-Zielproteine und als extrazelluläres Zytokin. [22] Letzteres funktioniert als Aktivator von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen zur Stimulation der IFN- γ -Produktion und induziert das Einwandern dendritischer Zellen und neutrophiler Granulozyten. [22]

Die Proteinkinase R (PKR) ist eine antiviral wirkende IFN-induzierte Kinase, abhängig von doppelsträngiger RNA (dsRNA). [23] Der zweite Signalweg ist demnach der PKR-Signalweg. [23] Hier bindet virale dsRNA an die PKR, wodurch es zu Autophosphorylierung kommt. [23] Als nun aktivierte Kinase phosphoryliert die PKR selbst weitere Faktoren, die dann die allgemeine Protein-Biosynthese hemmen, was schlussendlich zum Zelltod der infizierten Zelle führt. [23]

Des Weiteren gibt es einen IFN-induzierten Signalweg der antiviralen Abwehr, der über das 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS)-System funktioniert und daher 2',5'-OAS/Ribonuklease L (RNase L)-Signalweg genannt wird. [24] Aktivierte OAS ermöglichen die Polymerisation von ATP zu 2',5'-Oligomeren, die dann wiederum als Aktivatoren für die endogene Endoribonuklease RNase L dienen. [24] In der Folge spaltet die aktivierte RNase L sowohl zelluläre als auch virale mRNA, was am Ende zum kontrollierten Zelltod führt. [24]

Zuletzt gilt es den MX-GTPase-Signalweg zu erwähnen. [25] MX1 ist eine GTPase, die Teil der antiviralen Abwehr ist. [25] Induziert durch Typ I und Typ III IFN, blockiert MX1 virale Transkription und Replikation, wobei der molekulare Mechanismus bisher nicht bekannt ist. [25] Die Bindung an GTP scheint aber ein wichtiger Bestandteil für die antivirale Wirkung des MX1 zu sein. [25] Außerdem wird angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen der antiviralen Aktivität und der subzellulären Lage des MX1 besteht. [25] Das menschliche MX1 ist ein zytoplasmatisches Protein, das heißt, dass es gegen Viren wirkt, die sich im Zytoplasma replizieren. [25]

Eine erst kürzlich beschriebene Art der AVP sind die Interferone des Typs III bzw. der Untergruppe Lambda (λ). Es ist lange bekannt, dass die Familie der Interferone (IFN) zu den Hauptkomponenten der angeborenen Immunität zählen und auch in der viralen Abwehr eine wichtige Rolle spielen. [21] Die Interferon-Familie besteht aus drei Typen: IFN Typ I (IFN- α , IFN- β , etc.), IFN Typ II (IFN- γ) und IFN Typ III (IFN- λ) [26, 27] IFN- λ lässt sich weiter unterteilen und enthält unter anderem IFN- λ 1, das auch IL-29 genannt wird. [27] Die Einteilung erfolgt anhand der genetischen, strukturellen und funktionellen Eigenschaften und den verwandten Rezeptoren. [27] So binden Typ I IFN an IFNAR (IFN- α -Rezeptor), bestehend aus IFNAR1 und IFNAR2. Typ II IFN binden an IFNGR (IFN- γ -Rezeptor) und TYP III IFN binden an IFNLR1 (IFN- λ -Rezeptor 1) und IL-10R2. [21] Die Expression von über 300 IFN-stimulierten Genen kann beispielsweise durch Bindung von Typ I IFN an IFNAR [21] über Janus-Kinase (JAK)- und „*signal transducers and activators of transcription*“ (STAT)-Signalwegen induziert werden. [27] Obwohl nur wenige dieser in direktem Zusammenhang mit der antiviralen Abwehr stehen, können viele Genprodukte sogenannte „*pattern-recognition-receptors*“ (PRRs) kodieren, die unter anderem dem Erkennen und Vernichten viraler Moleküle dienen. [21]

1.6 Erkrankungen der Haut und des Gelenks

Im Nachfolgenden wird jeweils eine häufig auftretende Autoimmun-Erkrankung der Haut und eine Erkrankung mit Gelenkbeteiligung beschrieben. Bei einer Autoimmun-Erkrankung greift das Immunsystem des Körpers fälschlicherweise körpereigene Zellen an. [28]

1.6.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche, systemische Erkrankung, die hauptsächlich die Haut betrifft. [29] Schätzungsweise 2 bis 3 % der Bevölkerung sind von dieser Erkrankung betroffen. [28] Psoriasis zeichnet sich klinisch durch Entzündung, Schmerz, Juckreiz, Krustenbildung, Entstehung von Plaques, teilweise auch mit Beteiligung von Nägeln und Gelenken sowie histologisch durch hyperproliferierte Keratinozyten aus. [28] Ernstzunehmende Komorbiditäten, also zusätzlich zur Grunderkrankung auftretende Erkrankungen, sind bei der Psoriasis

keine Seltenheit. [28] Es handelt sich hierbei häufig um verschiedene entzündliche, metabolische und psychische Erkrankungen. Zudem sind die Komponenten des metabolischen Syndroms wie Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes, Adipositas und kardiovaskuläre Folgeerkrankungen zu nennen bis hin zu Herzinfarkt und Schlaganfall sowie Angsterkrankungen und Depression. [29] Die klinischen Symptome werden durch eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren bestimmt. [30] So entstehen bei der Psoriasis lokale und systemische chronische Entzündungsprozesse. [28] Die Regulation pro- und antiinflammatorischer Mediatoren in dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T- und B-Zellen, Keratinozyten und Synoviozyten ist bei diesen Patienten gestört. Für die Entwicklung von Psoriasis ist die Interaktion myeloider dendritischer Zellen und T-Zellen ein wesentlicher Bestandteil. Die T-Zellen proliferieren und differenzieren sich zu T_H1 -Zellen und T_H17 -Zellen als Reaktion auf die Antigen-Präsentation der dendritischen Zellen. Von diesen T-Helferzellen werden nun Zytokine exprimiert, wie IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17 und IL-22. Psoriasis-Patienten zeigen dementsprechend auch erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren, sowohl im Gewebe als auch im Blut. [28]

1.6.2 Psoriasis-Arthritis

Ungefähr 30 % der Psoriasis-Patienten, [15] Frauen jedoch häufiger als Männer, [31] leiden zusätzlich an der sogenannten Psoriasis-Arthritis (PsA). [15] Die PsA ist eine seronegative (Rheumafaktor (RF)-negative), immunologisch ausgelöste Gelenkerkrankung. [31] Neben den Symptomen der Grunderkrankung Psoriasis kommt es hier zu entzündlichen Beschwerden in den Gelenken. [15] Die PsA befällt vor allem die kleinen Gelenke von Fingern und Zehen, aber auch einzelne große Gelenke können betroffen sein. [31] Häufig ist der Gelenkbefall asymmetrisch, außerdem können übergreifend noch Sehnen, Bänder und Kapseln betroffen sein. [31] Das Nebeneinander von proliferativen und degenerativen Prozessen bei der PsA ist charakteristisch und ein Unterscheidungsmerkmal zur rheumatoiden Arthritis. [31] Die klinischen Beschwerden reichen von einfachen Gelenkschmerzen über röntgenologische osteoartikuläre Anomalien bis zu Polyarthritiden mit Gelenkdeformationen, [32] z. B. in Form von Wurst- oder Teleskopfingern. [31] Im Normalfall tritt die Psoriasis zuerst auf, nach einiger Zeit, teils auch Jahre später,

folgt die PsA. [31] Nur sehr selten beginnt das Krankheitsbild mit dem Rheumatismus. Der Krankheitsverlauf vollzieht sich schubweise, wobei die Psoriasis- und die PsA-Schübe synchron auftreten können, aber nicht müssen. [32] Die Entstehung beruht auch hier auf T-Zellen, die durch Antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden, wodurch es dann in den Gelenken zu chronischen Entzündungsreaktionen kommt. [31] Die Abgrenzung der PsA zur rheumatoiden Arthritis ist nicht ganz leicht, da beide viele klinische Gemeinsamkeiten aufweisen. [31]

Wie bei der Psoriasis ist bei der PsA die genetische Veranlagung ein Risikofaktor für diese Erkrankung. [31] Exogene Faktoren, wie mikrobielle und virale Infekte sind häufig Auslöser für die PsA. [31] Im Unterschied zur Psoriasis wird die PsA eher weniger durch Medikamente getriggert. [31] Nach Moll und Wright wird die PsA in fünf Unterformen unterteilt, nämlich Wirbelsäulenbeteiligung (5-40 %), mutilierende Arthritis (ca. 5 %), distale, interphalangeale Arthritis (5-10 %), symmetrische Polyarthritits (bis 20 %) und asymmetrische Oligoarthritits (ca. 70 %). [31]

1.7 Apremilast

Apremilast (Handelsname Otezla®) wird als Monotherapie bei mittelschwerer bis schwerer Psoriasis oder als Mono- oder Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten bei der aktiven PsA angewendet. [33] Es ist das erste oral einzunehmende Arzneimittel, das seine Wirkung gezielt intrazellulär entfacht und gegen Psoriasis und PsA nachgewiesen gut wirkt sowie eine gute Verträglichkeit aufweist. [34] Apremilast ist ein kleines Molekül mit dem relativen Molekulargewicht von 460 Da. [34] Es wird synthetisch hergestellt und blockiert selektiv die katalytische Region von PDE4. [34] Durch diese Blockade wird Apremilast auch als PDE4-Inhibitor bezeichnet und greift hemmend in die Entzündungskaskade ein. [34]

Jede Tablette beinhaltet 30 mg des aktiven Wirkstoffs. [33] Weitere Bestandteile sind mikrokristalline Cellulose, Lactose-1-Wasser, Lactose, Croscarmellose-Natrium, Magnesiumstearat, Poly(venylalkohol), Titandioxid, Macrogol 3350, Talkum, Eisen(III)-oxid, schwarzes Eisen(III)-oxidhydrat und Eisen(II,III)-oxid. [33]

Eine Überempfindlichkeit gegen die Inhaltsstoffe spricht gegen die Behandlung mit diesem Arzneimittel. [33] In der Regel wird die Dosierung dieses Medikaments langsam erhöht, bis eine für den Patienten passende Erhaltungsdosis erreicht ist. [33] Für diese Phase stehen Arzneimittel mit verschiedenen Wirkstoffstärken zur Verfügung. [33] Die Dosierung ist abhängig von der Erkrankung und dem Stadium der Behandlung, aber grundsätzlich wird je 1 Tablette morgens und 1 Tablette abends im Abstand von 12 Stunden Mahlzeiten-unabhängig eingenommen. [33] Zu den unerwünschten Nebenwirkungen zählen Entzündungen der Bronchien, Infektionen der oberen Atemwege sowie Nasen-Rachenentzündungen. [33]

1.7.1 Phosphodiesterasen und ihre Inhibition

Im gesamten Körper werden intrazelluläre Signale und Reaktionen auf Umweltfaktoren durch zentrale sekundäre Botenstoffe wie das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) reguliert. [28] Diese zyklischen Nukleotide sind somit bei der Regulation physiologischer Vorgänge wie Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Entzündung und metabolischen Prozessen beteiligt. [34] Erhöhtes intrazelluläres cAMP ergibt eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Die aktivierte PKA wiederum aktiviert bestimmte Transkriptionsfaktoren wie das *cAMP-response element binding protein* (CREB). Durch die Aktivierung der CREB-Familie wird indirekt NF- κ B inhibiert, da sowohl NF- κ B als auch CREB um den Transkriptions-Koaktivator, das *CREB-binding protein* (CBP) konkurrieren. [28] Dieses bindet bevorzugt an CREB, sodass NF- κ B gehemmt wird. Unabhängig von Signalweiterleitung über das CREB, wirkt cAMP auch über cAMP-gebundene Ionenkanäle. In allen Fällen kommt es bei erhöhtem intrazellulärem cAMP am Ende zu einer Senkung proinflammatorischer und zu einer Steigerung antiinflammatorischer Zytokine. [28]

Phosphodiesterasen (PDE) sind Enzyme, die überall im Körper vorkommen und Phosphodiester-Bindungen aufspalten. [34] Dadurch wird das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) und das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) zu AMP und GMP umgewandelt. [34] Es sind elf verschiedene Typen der PDE bekannt (PDE1 bis PDE11), die die intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP

steuern. [34] Die Isotypen verteilen sich in Organen und Geweben unterschiedlich und weisen eine differente Substratspezifität auf. [34] So gibt es PDE die sowohl cAMP als auch cGMP spalten (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, PDE11), jedoch auch welche, die ausschließlich cGMP (PDE5, PDE6, PDE9) oder ausschließlich cAMP (PDE4, PDE7, PDE8) hydrolisieren. [34]

PDE4 ist eine der cAMP-selektiven PDE (Abb. 4). [34] Es gibt wiederum vier verschiedene Subtypen (A, B, C, D) und mehr als 20 unterschiedliche Isoformen. [28] Das Vorkommen verteilt sich auf Epithelzellen, dendritische Zellen, T-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Keratinozyten. [34]

PDE4 setzt den intrazellulären cAMP-Spiegel herab, wodurch die Produktion proinflammatorischer Zytokine gefördert und die Bildung antiinflammatorischer Mediatoren gehemmt wird. Die Inhibierung von PDE4 (durch Apremilast) erhöht entsprechend die intrazelluläre cAMP-Konzentration, [28] hemmt die Zytokinproduktion und beeinflusst so die Entzündungskaskade. [34] Dementsprechend wird die Bildung proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α , IFN- γ und [28] IL-17, denen eine bedeutende Rolle bei der Psoriasis und Psoriasis-Arthritis zugeschrieben wird, [34] gehemmt und die Bildung der antiinflammatorischen Zytokine, wie IL-10 wird hochreguliert. [28]

Der PDE4-Inhibitor Apremilast zeigt keine Selektivität zwischen einzelnen PDE4-Subtypen. [28]

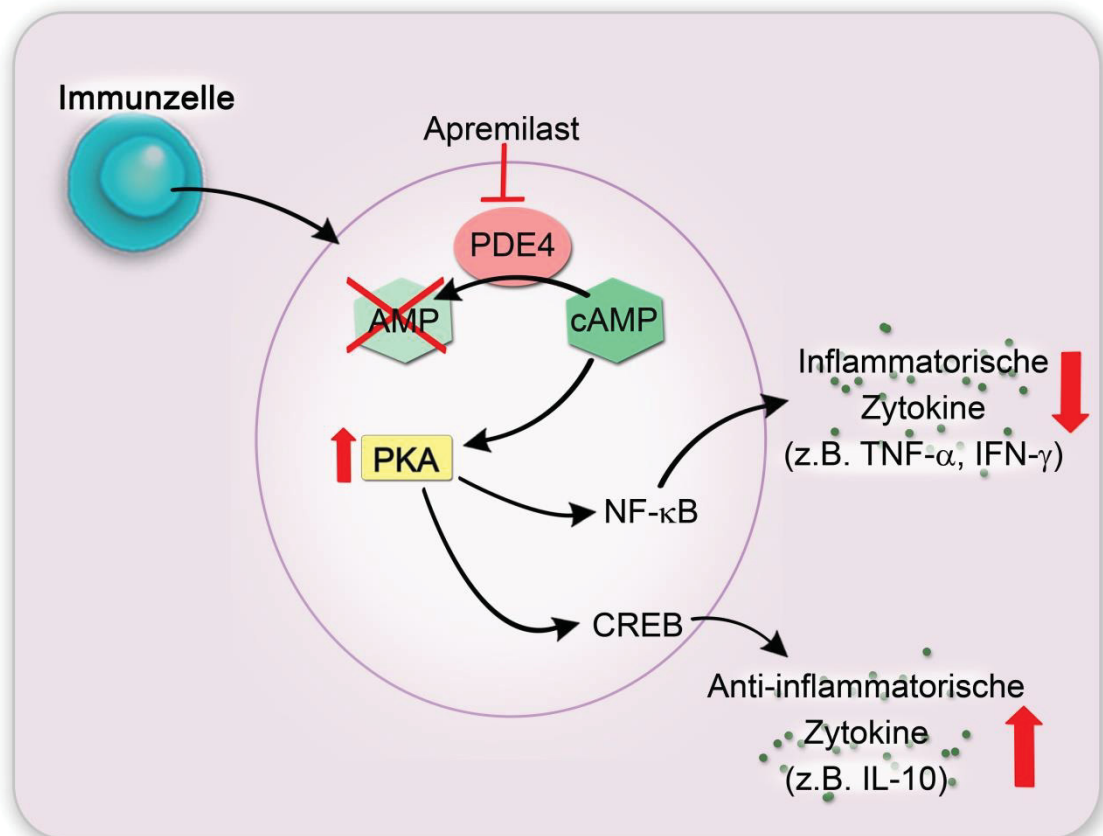


Abb. 4: Wirkmechanismus von Apremilast. Apremilast hemmt die Phosphodiesterase 4 (PDE4), wodurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel gesteigert wird. So wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, wodurch es durch Aktivierung von *cAMP response element-binding protein* (CREB) und Inhibierung von *nuclear factor κB* (NF-κB), zu verminderter Expression proinflammatorischer und zu erhöhter Expression antiinflammatorischer Zytokine kommt. AMP=Adenosinmonophosphat; cAMP=zyklisches AMP. (Eigene Zeichnung)

1.7.2 Nebenwirkungen

Durch die Therapie mit Apremilast kommt es oft zu Übelkeit und Erbrechen. [35] Diese gastrointestinalen Beschwerden verschwinden jedoch nach einiger Zeit und durch eine Senkung der Dosis können diese Nebenwirkungen auch vermindert werden. [35] Auch ein Gewichtsverlust von bis zu 5 % des Ausgangswertes ist mit der Apremilast-Therapie assoziiert worden. [35] Als weitere unerwünschte Nebenwirkungen sind Nasopharyngitis, Infektionen der oberen Atemwege und Entzündungen der Bronchien beobachtet worden. [33, 35]

1.8 Ziele der Arbeit

Die Psoriasis mit sowie ohne Psoriasis-Arthritis stellt eine chronisch-entzündliche, systemische Erkrankung dar, mit der eine Anzahl an Begleiterkrankungen assoziiert ist. Durch den neuartigen Wirkstoff Apremilast ist eine weitere sehr wirksame Behandlungsmöglichkeit etabliert worden. Als erstes oral einzunehmendes Arzneimittel stellt es ein Medikament gegen Psoriasis und PsA dar, das eine gute Wirksamkeit und hohe Verträglichkeit hat. Es wirkt gezielt intrazellulär durch Blockade der PDE4, wodurch der cAMP-Spiegel in der Zelle erhöht wird und dadurch die Produktion proinflammatorischer Mediatoren herabgesetzt und die der antiinflammatorischen Zytokine erhöht wird. In der Folge wird auch die Expression antimikrobieller Peptide möglicherweise beeinflusst. Trotz der recht guten Verträglichkeit sind Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, aber auch Nasopharyngitis und Infektionen der oberen Atemwege beobachtet worden. Aufgrund dieser Nebenwirkungen entstand die Frage, inwieweit Apremilast Einfluss auf die antimikrobielle und antivirale Abwehr ausübt.

Als Zellen für diese Studie wurden Keratinozyten, Synoviozyten als auch CD4⁺-T-Zellen ausgewählt. Keratinozyten als Zielzellen in der Psoriasis, Synoviozyten als Zielzellen in der PsA und schließlich CD4⁺-T-Zellen, zur Repräsentation des Immunsystems. Zunächst wurde hierbei die Frage gestellt, ob Apremilast die Zellvitalität dieser Zelltypen beeinflusst und falls ja, in welchem Maße. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob und wie Apremilast die Genexpression als auch die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten und Synoviozyten verändert. Da die PDE4-Inhibition sich positiv auf die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen auswirkt, wurde zudem die Frage untersucht, ob sich Apremilast auf die Differenzierung von T_H17-Zellen auswirkt und die Gegenwart von Apremilast einen eher „klassischen“ T_H17-Zelltyp hervorbringt anstatt einen „alternativen/pathogenen“ T_H17-Zelltypen. Die erhöhten Infektionen der Atemwege unter Behandlung mit Apremilast definierten das letzte Ziel dieser Arbeit; die Untersuchung der IFN- γ -Sekretion in Apremilast-behandeltem Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose.

2 Material und Methoden

2.1 Humane Proben

Alle Experimente mit humanen Proben sind von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf genehmigt worden (Ethikvotum 5775 R und *Amendments*). Sämtliche Spender haben ihr Einverständnis zur Verwendung ihrer Probe gegeben.

Primäre Keratinozyten wurden sowohl aus Vorhautpräparaten als auch aus überschüssiger Haut nach medizinischen Eingriffen wie einer Mammareduktion isoliert.

Primäre Synoviozyten (*primary human fibroblast-like synoviocytes*, HFLS) von normalem humanem Synovialgewebe wurden von Cell Applications Inc. (San Diego, USA) bezogen.

Buffy Coats von gesunden Spendern für die Isolation von CD4⁺-T-Zellen wurden über die Blutspendezentrale des Uniklinikums Düsseldorf bezogen.

Für die Durchführung der Lymphozyten-Stimulation mit Varizellen-Antigen wurden ca. 25 ml Blut von gesunden Probanden in sogenannten CPT-Röhrchen (*BD Vacutainer Cell-Preparation Tubes* (CPT™), BD Biosciences) benötigt.

Für die Durchführung des modifizierten QuantiFERON® Assays (Kapitel 2.9) wurde Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose über das Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Uniklinikums Düsseldorf bezogen.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Keratinozyten

Kultivierung

Zunächst wurde warmes Serum-freies Keratinozyten-Medium (*serum-free medium* (SFM), Gibco) mit humanem rekombinantem epidermalem Wachstumsfaktor (*recombinant epidermal growth factor* (rEGF)) und „*Bovine Pituitary Extract*“ (BPE) in einem 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Die eingefrorenen Keratinozyten

wurden im Wasserbad aufgetaut, in das 15 ml Sammelrohr mit Medium überführt und bei Raumtemperatur (RT) für 8 min bei 1250 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* (rpm)) zentrifugiert. Das Keratinozyten-Pellet wurde in Medium resuspendiert und in eine 175 cm²-Zellkulturflasche mit einem Volumen von 30 ml gegeben. Die Keratinozyten wurden dann eine Woche bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator belassen.

Nach dieser Inkubationszeit haben die Keratinozyten eine sogenannte Konfluenz von ungefähr 80 % erreicht, d. h. 80 % der Oberfläche der Zellkulturfläche waren mit Zellen bedeckt. Die Keratinozyten wurden nun ausgedünnt. Dazu wurde zunächst das Keratinozyten-Medium abgenommen und die am Flaschenboden adhärenen Keratinozyten wurden vorsichtig mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline* (PBS)) gewaschen. Im Anschluss wurden 9 ml Accutase (Dispase, PanBiotech) auf die Keratinozyten pipettiert. Mithilfe eines Mikroskops wurde der Ablöseprozess der Keratinozyten verfolgt. Die abgelösten Zellen wurden dann in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, bevor das Röhrchen für 8 min bei 1250 rpm und RT zentrifugiert wurde. Die Keratinozyten wurden in 5 ml frischem Medium aufgenommen und unverdünnt in einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Neubauer Improved Einweg-Zählkammer; NanoEntek Inc.) gezählt. Zum Aussäen wurde eine Ausgangskonzentration von 4000 Zellen pro cm² gewählt. Ein *well* im 12-*well*-Format hat eine Fläche von ungefähr 3,8 cm² und ein *well* im 96-*well*-Format 0,32 cm². Entsprechend dieser Angaben wurden die Keratinozyten dann in Medium verdünnt und ausgesät.

Keratinozyten-Stimulation

Für die Keratinozyten-Stimulation wurden die Keratinozyten auf 12-*well*-Platten in 1 ml Medium ausgesät und bei 37°C bis zu einer Konfluenz von 80 % inkubiert. Zu Beginn des Versuchs wurde das alte Medium entfernt und durch 980 µl neues Medium ersetzt. Sämtliche Stimulationsbedingungen wurden in Duplikaten durchgeführt, d. h. ein stimulierendes Reagenz wurde immer in zwei unabhängige Ansätze gegeben. In zwei *wells* wurden im Anschluss 2 µl DMSO (Kontrolle; Lösungsmittel des Apremilast) zugefügt, in jeweils 12 *wells* wurden 2 µl Apremilast (finale Konzentration: 2 µM, MedChem Express, Princeton, USA) und in jeweils

weiteren 12 *wells* wurden 0,5 µl Apremilast (finale Konzentration: 0,5 µM) pipettiert. Die mit Apremilast und DMSO vorbehandelten Keratinozyten wurden nun für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach den 60 min wurden jeweils 1 µl von verschiedenen bakteriellen Oberflächenmolekülen (Lipopolysaccharide (LPS, finale Konzentration: 1 µg/ml), Lipoteichonsäure (LTA, final: 1 µg/ml), Lipoarabinomannan von *Mycobacterium tuberculosis* (LAM Mtb, final: 1 µg/ml)) und sekretierten Mtb-Proteinen (ESAT-6 und CFP-10, jeweils 100 ng/ml, PepMix, JPT Solutions, Berlin, Deutschland) als auch T-Zell-sekretierte Zytokine (IL-17, IFN-γ, IL-29, IL-22; Biotechne; jeweils final: 100 ng/ml) hinzugegeben. In anderen Experimenten wurden 10 µl von Varizella Vaccine (1 µg/ml, Sigma-Aldrich), 1 µl VZV gE (100 ng/ml, PepMix, JPT Solutions) und 1 µl VZV IE63 (jeweils final: 100 ng/ml, PepMix, JPT Solutions) in die entsprechenden Ansätze pipettiert (Tabelle 1). Je ein *well* mit Apremilast 2 µM und 0,5 µM wurde als Kontrolle nicht stimuliert. Es folgte eine 24 h Inkubationszeit bei 37°C, bevor die Zellen mithilfe von RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (β-ME) lysiert wurden für spätere RNA-Isolation (Kapitel 2.4) und Analyse mithilfe von quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, (qPCR)) (Kapitel 2.6).

Medium	IL-22 (100 ng/ml)
DMSO	IL-22 + A2
A2	IL-22 + A0,5
A0,5	LAM Mtb (1 µg/ml)
LPS (1 µg/ml)	LAM Mtb + A2
LPS + A2	LAM Mtb + A0,5
LPS + A0,5	ESAT-6+CFP-10 (100 ng/ml)
LTA (1µg/ml)	E+C + A2
LTA + A2	E+C + A0,5
LTA + A0,5	VZV Vaccine
IL-17 (100 ng/ml)	VZV Vaccine + A2
IL-17 + A2	VZV Vaccine + A0,5
IL-17 + A0,5	VZV gE
IFN-γ (100 ng/ml)	VZV gE + A2
IFN-γ + A2	VZV gE + A0,5
IFN-γ + A0,5	VZV IE63
IL-29 (100 ng/ml)	VZV IE63 + A2
IL-29 + A2	VZV IE63 + A0,5
IL-29 + A0,5	

Tabelle 1: Liste der verwendeten Stimulationsbedingungen. A2 = Apremilast (2 µM); A0,5 = Apremilast (0,5 µM)

In einer Variante des Experiments wurden die Keratinozyten mit T-Zell-Kulturüberständen inkubiert. Hierzu wurden die Keratinozyten ebenfalls auf 12-*well*-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % inkubiert. Zu 900 µl frischem Medium wurde hier 100 µl T-Zell-Kulturüberstand in das entsprechende *well* pipettiert. Das T-Zell-Medium RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI)) wurde als Kontrolle verwendet (100 µl), um Effekte des darin enthaltenen Serums auf Keratinozyten auszuschließen. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C wurde der Überstand gesammelt und die Zellen wurden mithilfe von RLT-Puffer mit β-ME lysiert.

2.2.2 Synoviozyten

Kultivierung

Das Auftauen der Synoviozyten erfolgte analog zur Keratinozyten-Kultivierung. Die Synoviozyten wurden in speziellem Synoviozyten-Wachstumsmedium (*Cell*

Applications) oder *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) GlutaMAX (Gibco) supplementiert mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Das Ausdünnen der Synoviozyten und anschließendes Aussäen erfolgte ähnlich des Protokolls für Keratinozyten anhand des Hersteller-Protokolls. Die adhärenenten Synoviozyten wurden mit 10 ml Salzlösung (*Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS)) gewaschen, bevor 10 ml der Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben wurde. Anschließend wurde die Zellkulturflasche für einige Minuten bei RT inkubiert, wobei der Ablöseprozess unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Die Reaktion wurde mit 5 ml einer Trypsin-Neutralisations-Lösung (*Cell Applications*) gestoppt. Die Zellsuspension wurde danach in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen für 5 min bei 1020 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert. Mit einer 10-fachen Verdünnung wurden die Zellen gezählt. Für eine 12-*well*-Platte wurden die Synoviozyten auf 38.000 Zellen pro ml (1 ml pro *well*) verdünnt. Bei einer 96-*well*-Platte mit 0,32 cm² pro *well* wurden für ein *well* 3.200 Zellen gebraucht (100 µl pro *well*).

Synoviozyten-Stimulation

Die Stimulation der Synoviozyten erfolgte analog zur Stimulation der Keratinozyten bei einer Konfluenz von 80 % in 12-*well*-Platten für 24 h. Im Gegensatz zu den Keratinozyten wurden die Synoviozyten entsprechend weiterhin im Synoviozyten-Medium kultiviert.

Um indirekte Effekte der PDE4-Inhibition in T-Zellen auf Synoviozyten zu untersuchen, wurden in einem abgewandelten Experiment die Synoviozyten in einer 12-*well*-Zellkulturplatte ausgesät und mit T-Zell-Kulturüberstand stimuliert. Dies erfolgte ebenso analog zu den Keratinozyten wie zuvor beschrieben. Details zur T-Zell-Kultur finden sich im folgenden Kapitel.

2.2.3 T-Zellen

PBMC-Isolation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden auf zwei verschiedene Arten entsprechend des Volumens des Ausgangsmaterials isoliert. Bei einer großen Menge Blut, wie man sie in einem *Buffy Coat* erhält, wurde das Ficoll-Separationsverfahren angewandt. Für ein kleines Blutvolumen wurden CPT-Röhrchen verwendet.

PBMC-Isolation aus *Buffy Coat*

Ein *Buffy Coat* ist eine Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die beim Zentrifugieren von Vollblut entsteht. Das Blut aus dem *Buffy Coat* wurde zunächst in eine Zellkulturflasche umgefüllt und mit PBS auf 125 ml aufgefüllt. Nun wurden vier 50 ml Falcon-Röhrchen mit je 15 ml Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) vorgelegt. Daraufhin wurde pro Röhrchen je 30 ml der Blut-PBS-Mischung vorsichtig auf die Ficoll-Schicht pipettiert. Das Blut sollte eine Phase oberhalb des Ficolls bilden. Die Röhrchen wurden nun bei 1150 rpm (ohne Beschleunigen und Abbremsen) für 20 min (RT) zentrifugiert. Die Lymphozytenschicht wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, bis 50 ml mit PBS aufgefüllt und anschließend bei 970 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet nun in 25 ml ACK-Lyse-Puffer (isotone Ammoniumchlorid-Lösung: 8,29 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 0,0375 g Na₂-EDTA in 1 l Wasser) resuspendiert, um Erythrozyten zu lysieren. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Kühlschrank wurde die Lyse-Reaktion mit 25 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde jetzt durch ein 100 µm Sieb in ein neues Röhrchen filtriert und dann wiederum bei 970 rpm für 10 min (RT) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 50 ml PBS resuspendiert, bevor die Zellen für weitere Applikationen gezählt wurden.

PBMC-Isolation aus CPT-Röhrchen

Für diese Art der Isolation mononukleärer Zellen wurde das Blut direkt in die speziellen CPT-Röhrchen (*Cell Preparation Tube*, BD) abgenommen. Diese

Blutentnahme-Röhrchen enthalten einen integrierten Ficoll-Gradienten, wodurch das konventionelle, manuelle Schichten von Ficoll und Blut wie oben beschrieben entfällt. Die mit Blut gefüllten CPT-Röhrchen wurden nun für 20 min (mit Beschleunigung, ohne Bremse) bei 2500 rpm bei RT zentrifugiert. Die gewünschten Lymphozyten wurden nun abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt, auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei 1250 rpm (RT) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml ACK-Lyse-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde diese Lösung für 10 min bei 4°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von PBS gestoppt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml RPMI-Medium (versetzt mit 5 % humanem AB Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Hier wurden die Zellen in einer 100-fachen Verdünnung gezählt und daraufhin für die Lymphozyten-Stimulation mit Varizella-Zoster-Virus-Antigen verwendet (Kapitel 2.8).

CD4⁺-T-Zell-Isolation

Aus den PBMC des *Buffy Coats* wurden im nun folgenden Schritt CD4⁺-T-Zellen isoliert. Es wurden $200 \cdot 10^6$ PBMC benötigt. Das berechnete Volumen Zellsuspension wurde in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 8 min bei 1250 rpm (RT) zentrifugiert. Im Anschluss wurden die T-Zellen mithilfe des *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben isoliert. Bei dieser Art der Separation handelt es sich zum einen um *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) und zum anderen um eine Negativ-Selektion, das heißt alle Zellen außer den gewünschten naiven CD4⁺-T-Zellen wurden mit magnetischen Kügelchen markiert. Dadurch wurde später ausgeschlossen, dass die Bindung der magnetischen Kügelchen einen Einfluss auf die Aktivität der gewünschten Zellen haben könnte. Zuerst wurde das Zellpellet in 40 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert, was bei $2 \cdot 10^8$ Zellen 800 µl entspricht. Hinzu kamen 10 µl *Naive CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II* pro 10^7 Zellen, also entsprechend 200 µl. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden 600 µl MACS-Puffer hinzugegeben. Schließlich wurden 400 µl *Naive CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail II* hinzugegeben und die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zell-Separation erfolgte nun mithilfe des autoMACS Pro Separator[®] (Miltenyi Biotec). Es wurde das Programm „*Depletes*“ ausgewählt. Nach Beenden des

Programms wurden die naiven CD4⁺-T-Zellen für 8 min bei 1250 rpm bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml RPMI-Medium (mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Die Zellen wurden nun gezählt und in die richtige Konzentration für weitere Experimente verdünnt.

T-Zell-Stimulation

Vor der Stimulation der T-Zellen wurden diese noch mithilfe des *Human T Cell Activation/Expansion Kits* (Miltenyi) anhand des Herstellerprotokolls aktiviert. Im ersten Schritt wurden 25 µl *iBead Particles* pro $5,5 \cdot 10^6$ Zellen, insgesamt also 75 µl, in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Hinzu kamen 600 µl RPMI-Medium. Diese Mischung wurde für 5 min bei 1250 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 300 µl RPMI-Medium resuspendiert, zu denen dann 2700 µl Zellsuspension hinzu pipettiert wurden. Schließlich wurde noch einmal das gleiche Volumen RPMI-Medium (3 ml) beigefügt, um $2,5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml zu erhalten. Die aktivierten Zellen (je 1 ml) wurden nun in sechs *wells* einer 24-*well*-Platte pipettiert. Danach wurde Apremilast in den Konzentrationen 2 µM und 0,5 µM hinzugefügt und 30 min inkubiert, bevor TGF-β1 (finale Konzentration: 20 ng/ml), IL-6 (final: 20 ng/ml), IL-23 (final: 10 ng/ml), anti-IL-4 (final: 1 µg/ml) und anti-IFN-γ (final: 1 µg/ml) hinzugegeben und dann für drei Tage inkubiert wurden. Diese Kombination an Zytokinen und Antikörpern sollte die naiven aktivierten T-Zellen in Richtung von T_H-17-Zellen differenzieren. Nach der Inkubationszeit wurde die T-Zell-Suspension aufgemischt, um die Zellklumpen der proliferierenden T-Zellen zu lösen. Die Hälfte des Gesamtvolumens (500 µl) eines Ansatzes wurde entnommen und in ein neues *well* gegeben. Zu jedem Ansatz wurden nun 500 µl frisches Medium 10 ng/ml IL-2 hinzugegeben, wodurch die T-Zellen final mit einer Konzentration von 5 ng/ml IL-2 versetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen für weitere vier Tage inkubiert, bevor der Überstand gesammelt wurde und die Lyse der T-Zellen erfolgte. Sowohl der Überstand als auch das Lysat wurden dann bei -20°C zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3 Zellvitalitätsassays

2.3.1 MTT-Assay für Keratinozyten

Funktionsweise des MTT-Assays

Mit einem MTT-Assay kann man die Lebensfähigkeit oder Vitalität verschiedenster Zellen überprüfen. Hierbei wird der MTT-Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid von vitalen Zellen aufgenommen und mittels zellulärer Dehydrogenasen zum blauen Formazan reduziert. Je mehr Formazan von den Zellen produziert wird, desto höher ist die mitochondriale Zellaktivität, wodurch dieser Test zur Prüfung der Lebensfähigkeit verwendet werden kann.

Durchführung

Für diesen Test wurden primäre 80 % konfluente Keratinozyten in einer 96-Flachboden-*well*-Platte verwendet. Es wurde dann eine Verdünnungsreihe von Apremilast und DMSO in Keratinozyten-Kulturmedium mit den Konzentrationen von 10 µM, 5 µM, 1µM, 0,5 µM, 0,1 µM und 0,05 µM vorbereitet. Als Positivkontrolle diente 5 % DMSO. Die entsprechenden Verdünnungen wurden dann in einem Volumen von 100 µl zu den Keratinozyten gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl *MTT Stock Solution* (5 mg/ml) zu den stimulierten Keratinozyten hinzugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeiten wurden 100 µl *MTT-Stop-Solution* in die *wells* gegeben. *MTT-Stop-Solution* enthält 49,7 ml Dimethylsulfoxid (DMSO), 0,3 ml Salzsäure (HCl) und 5 g Natriumdodecylsulfat (SDS). Nach Inkubationszeit von 20 min wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Plattenlesegerät TECAN infinite M200 Pro gemessen.

2.3.2 CellTiter-Glo® für Synoviozyten und T-Zellen

Funktionsweise von CellTiter-Glo®

Mit dem *CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay* (Promega) wird die Zahl vitaler Zellen in Kultur mittels Quantifizierung von Adenosintriphosphat (ATP) bestimmt, das die Anwesenheit von metabolisch aktiven Zellen nachweist. Das CellTiter-Glo®-

Reagenz führt zu einer Lyse der Zellen, wodurch das ATP freigesetzt wird. Es entsteht ein Lumineszenz-Signal, das proportional zu der vorhandenen ATP-Menge ist. Die ATP-Menge ist wiederum proportional zu der Menge der kultivierten und lebenden Zellen. Die im Reagenz enthaltene wärmestabile Luciferase führt dann zu einem Lumineszenz-Signal, welches mit dem entsprechenden Plattenlesegerät gemessen werden kann (Abb. 5).

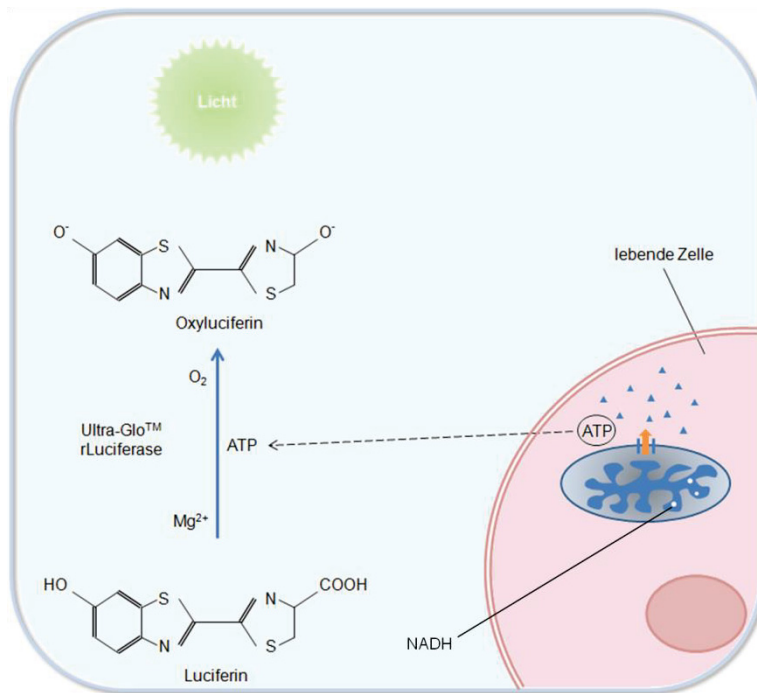


Abb. 5: Funktionsweise von CellTiter-Glo®. Die vitale Zelle produziert ATP, das für die Luciferase-Reaktion benötigt wird. Je mehr ATP vorhanden ist, also lebende Zellen existieren, desto höher ist die entstehende Lumineszenz. NADH = Nicotinamidadeninindinukleotid, O₂ = Sauerstoff, Mg²⁺ = Magnesium (Darstellung modifiziert nach: Herstellerprotokoll)

Synoviozyten-Stimulation für CellTiter-Glo®

Für diesen Versuch wurden Synoviozyten in einer weißen 96-well-Zellkulturplatte benötigt. Zunächst wurde analog zu den Keratinozyten eine Verdünnungsreihe mit Apremilast und DMSO (Kontrolle) in Synoviozyten-Medium angelegt. Die Synoviozyten wurden dann mit 100 µl der entsprechenden Apremilast- oder DMSO-Verdünnung stimuliert. Als Kontrollen dienten entweder Synoviozyten-Medium ohne Zusätze, 1 % Triton (Positivkontrolle) und zellfreie wells mit Kulturmedium. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert.

T-Zell-Stimulation für CellTiter-Glo®

Für diese Stimulation wurden aus *Buffy Coats* mittels des *Pan T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) T-Zellen isoliert, die dann in einer Konzentration von 200.000 Zellen pro *well* auf einer weißen 96-*well*-Platte ausgesät wurden. Zu den 50 µl Zellsuspension wurde dann eine Serie mit unterschiedlichen Konzentrationen des Apremilast und DMSO als Kontrolle gegeben. Die höchste Konzentration Apremilast betrug hierbei final 10 µM und die niedrigste 0,05 µM analog zur Beschreibung der Synoviozytenstimulation im vorherigen Kapitel. Unbehandelte T-Zellen erhielten 50 µl RPMI-Medium und als Positivkontrolle diente ebenfalls 1 % Triton. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37°C wurde der *CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay* durchgeführt.

Durchführung

Zur Herstellung des CellTiter-Glo®-Reagenz wurde ein komplettes Fläschchen (10 ml) des CellTiter-Glo® -Puffer in ein Fläschchen CellTiter-Glo®-Substrat überführt und invertiert. Unabhängig vom Zelltyp wurde nun nach Ablauf der Inkubationszeit in jedes *well* 100 µl des CellTiter-Glo®-Reagenz pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 10-15 min zur Stabilisierung des Lumineszenz-Signals, wurde die Lumineszenz anhand des Plattenlesegeräts TECAN infinite M200 Pro detektiert.

2.4 RNA-Isolation

2.4.1 Durchführung

Die RNA-Isolation wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach Herstellervorgaben durchgeführt.

Nach dem Auftauen der Zell-Lysate wurden zunächst zu jeder Probe 350 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und gemischt. Das entstandene Gesamtvolumen von 700 µl wurde anschließend auf eine RNeasy Mini Säule (in einem 2 ml Röhrchen) gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nun wurde die RNeasy Mini Säule mit 700 µl RW1-Puffer und durch Zentrifugation für 15 s bei 10.000 rpm gewaschen. Daraufhin wurde die Säule zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Im ersten Durchgang wurden die Proben nochmals für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert, im

zweiten Durchgang für 2 min bei 10.000 rpm und dann noch einmal für 1 min bei 13.200 rpm. Zuletzt wurden die RNeasy Mini Säulen auf 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesteckt und 30-35 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silicia-Gel-Membran in der Säule pipettiert. Nach einer Inkubation von 3 min bei RT wurden die Proben final für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.

2.4.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der entstandenen RNA wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000c und dessen Programm „*Nucleid Acid*“ gemessen. Zur Messung wurde dann 1,5 µl Probe auf den Mess-Sockel pipettiert. Das Spektrophotometer gab nun sowohl die Konzentration der RNA in ng/µl aus, als auch die Qualität der RNA gemessen am Extinktionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm und 280 nm.

2.5 cDNA-Synthese/reverse transcriptase PCR

2.5.1 Prinzip

Aus der gewonnenen mRNA wird mithilfe eines Enzyms namens reverser Transkriptase ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) hergestellt (Abb. 6). Im ersten Schritt wird genomische DNA durch Zugabe von DNase aus der RNA-Präparation entfernt. Die RNA wird dabei durch einen RNase-Inhibitor (RNAsin) geschützt. Im zweiten Schritt wird dann mithilfe von Oligo dT Primern und Random Primern ein RNA-cDNA-Doppelstrang synthetisiert. Im letzten Schritt wird dieser RNA-cDNA-Doppelstrang mithilfe einer RNase aufgetrennt und der RNA-Strang wird abgebaut. Aus den zugegebenen Nukleosidtriphosphaten wird ein cDNA-Strang gebildet, um schlussendlich einen stabilen cDNA-Doppelstrang zu erhalten. [36] Mithilfe der cDNA können anschließend Gene analysiert werden.

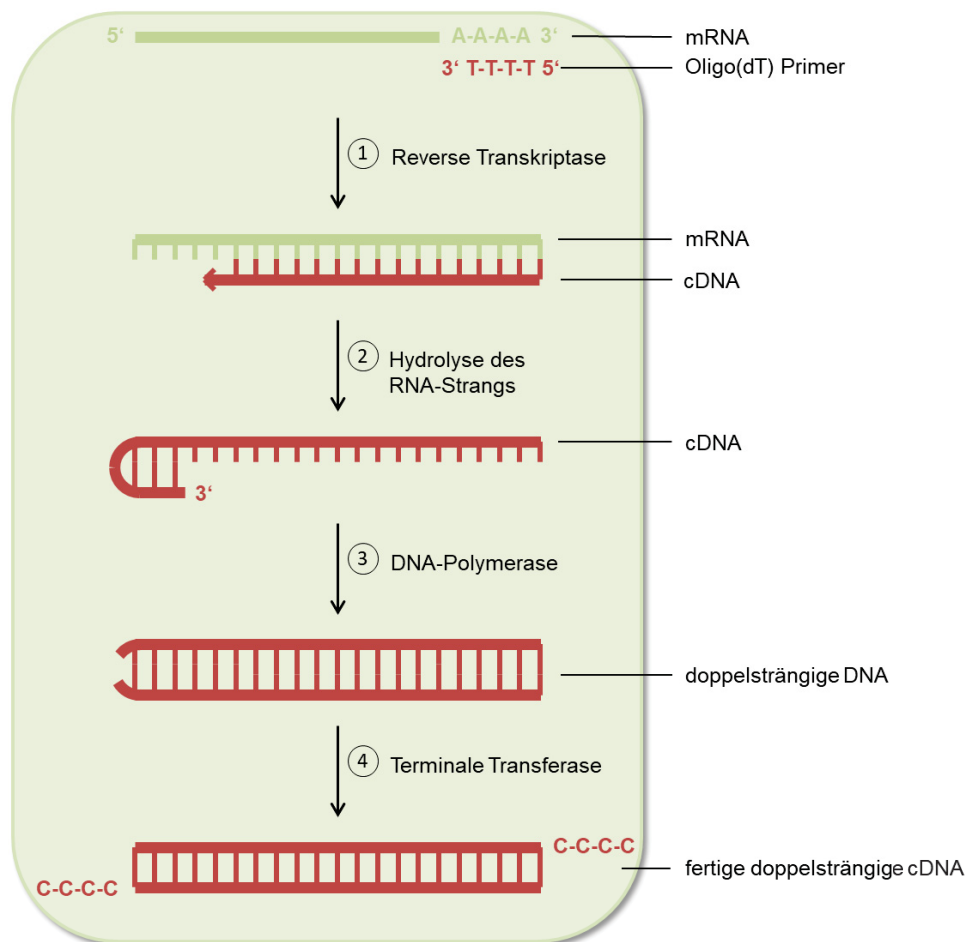


Abb. 6: cDNA-Synthese. mRNA wird mit Oligo(dT)-Sequenzen als Primer für die reverse Transkriptase gemischt und es kommt zur Basenpaarung mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA (1). Nach Entstehung eines DNA-RNA-Hybrids wird die RNA durch eine RNase hydrolysiert (2). Eine DNA-Polymerase stellt dann eine doppelsträngige DNA her (3). Zuletzt werden mithilfe der terminalen Transkriptase an die beiden Enden der cDNA kurze synthetische DNA-Sequenzen angeheftet, um geeignete Restriktionsstellen zu erhalten (4). (Darstellung modifiziert nach: Scharf, M.G., M.; von Eckardstein, A., Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. 2009: URBAN&FISCHER) [36]

2.5.2 Durchführung

Bevor mit der eigentlichen Synthese begonnen werden konnte, wurden die drei benötigten Reagenz-Mischungen angesetzt (Tabelle 2). Reagenz-Mischung 1 für eine Probe bestand aus 1,5 µl *First strand buffer 5x* (invitrogen), 1 µl Rnasin (Promega), 1 µl Dnase Mix (Roche) und 2,5 µl Wasser. Die Reagenz-Mischung 2 bestand aus 1 µl Oligo dT (invitrogen), 0,4 µl Random Hexamer/Primer (Promega) und 2,6 µl Wasser. In die Reagenz-Mischung 3 kamen 4,5 µl *First strand buffer 5x* (invitrogen), 1,5 µl dNTP (Bioline), 1 µl DTT (invitrogen), 0,5 µl Rnasin (Promega),

1,5 µl Wasser und zuletzt 1 µl SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Die Menge der Mixe wurde für die jeweilige Anzahl der RNA-Proben angepasst.

Für die cDNA-Synthese wurde eine Menge von 4 µg RNA verwendet. Beginnend wurden nun maximal 10 µl der entsprechenden RNA in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Zu den 10 µl der RNA-Probe wurden nun 6 µl der Reagenz-Mischung 1 gegeben und gemischt. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und in den sogenannten Thermocycler (TRIO Thermoblock mit beheizbarem Deckel, Biometra) gestellt. Das erste Programm war wie folgt: 20 min bei 37°C, dann 10 min bei 70°C und schließlich 4°C. Anschließend wurde zu jeder Probe 4 µl von der Reagenz-Mischung 2 hinzu pipettiert und gemischt. Die Proben wurden dieses Mal für 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf 4°C wurden 10 µl Reagenz-Mischung 3 hinzugefügt und erneut im Thermocycler inkubiert (50 min bei 42°C, dann 10 min bei 70°C). Nach dem Beenden des dritten Programms wurden die Proben auf 4°C gekühlt und dann mit Wasser auf eine Konzentration von 10 µg/ml cDNA verdünnt. Der letzte Schritt bestand nun darin, eine 1:4 Verdünnung auf einer sogenannten „*Masterplate*“ herzustellen. Hierfür wurden 150 µl Wasser in einer 96-well-Platte vorgelegt und anschließend 50 µl cDNA hinzugefügt (finale Konzentration: 2,5 µg/ml). Die restliche cDNA und die *Masterplate* mit verdünnter cDNA wurden bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Mix 1	1x
First strand buffer 5x (invitrogen)	1,5 µl
Rnasin (Promega)	1 µl
Dnase Mix (Roche)	1 µl
Wasser	2,5 µl
Mix 2	1x
Oligo dT (invitrogen) 16-18	1 µl
Random Hexamer/Primer (Promega)	0,4 µl
Wasser	2,6 µl
Mix 3	1x
First strand buffer 5x (invitrogen)	4,5 µl
dNTP (Bioline)	1,5 µl
DTT (invitrogen)	1 µl
Rnasin (Promega)	0,5 µl
Wasser	1,5 µl
SuperScript®	1 µl

Tabelle 2: Mengenangaben der Reagenzien pro Probe für die drei benötigten Mixe.

2.6 qPCR - quantitative Echtzeit-PCR

2.6.1 Einleitung

Mit der Polymerase Kettenreaktion (engl.: *Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) können zahlreiche Duplikate von DNA hergestellt werden, indem bestimmte DNA-Sequenzen enzymatisch vervielfältigt werden. Zunächst werden die DNA-Stränge denaturiert und somit getrennt (Abb. 7). Es folgt die sogenannte Hybridisierung, wobei sich die Primer mit Sequenzen passend zum zu analysierenden Gen an die entstandenen Einzelstränge anlagern. Dabei bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nukleinbasen aus. Der Vorgang wird mit der Kettenverlängerung abgeschlossen. Diese Schritte laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab und bilden einen Zyklus, der 20-50-mal wiederholt wird und für die Vervielfältigung der DNA des zu untersuchenden Gens sorgt. [37] Bei der quantitativen Echtzeit-PCR wird Fluoreszenz gemessen, die dann proportional zum analysierten Gen ist. Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten. Im weiteren Verlauf wurden hier entweder SYBR® Green oder TaqMan®-Farbstoffe angewandt. SYBR® Green ist ein Farbstoff, der an DNA-Sequenzen bindet und die dadurch entstehende Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen. Bei der Methode mit TaqMan®

verwendet man ein Primer-Paar, also auch eine sogenannte TaqMan[®]-Probe. Diese „Probe“ ist Fluoreszenz-markiert und ist so gewählt, dass sie mit der neu-synthetisierten DNA zwischen den beiden Primer-Paaren hybridisiert. Die Fluoreszenz, die von der Probe emittiert wird, wird dann während der Elongation gemessen.

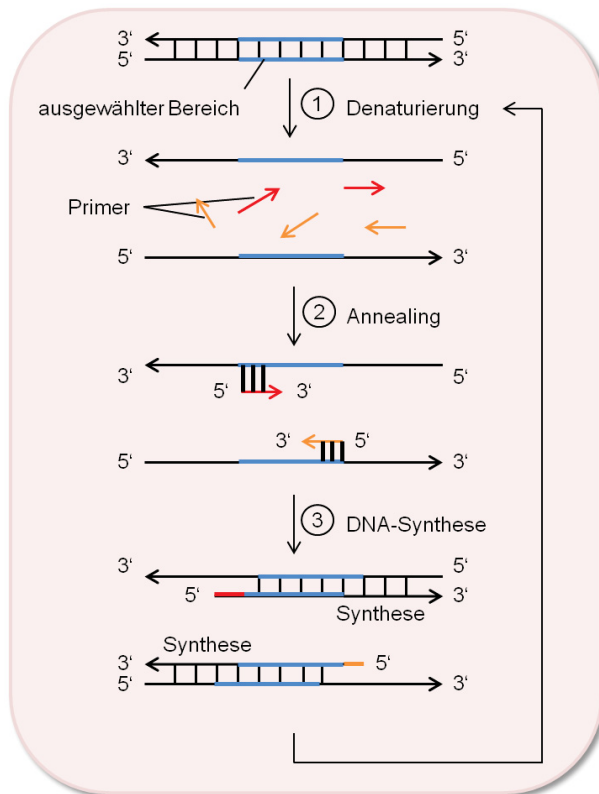


Abb. 7: Zyklus der PCR. Der Zyklus wird ungefähr 20-40-mal durchlaufen. Die Denaturierung (1) findet bei circa 95°C statt. Für das Annealing (2, Anlagerung der Primer) wird die Temperatur auf 40-70°C reduziert, abhängig nach Primerpaar. Die DNA-Polymerase für die DNA-Synthese arbeitet schließlich bei ungefähr 70°C. (Darstellung modifiziert nach: Rassow, J.H., Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer, Duale Reihe - Biochemie. 2008: Thieme) [38]

2.6.2 TaqMan[®] real-time PCR

House keeping gene

Um die Expression verschiedener Gene vergleichen und normalisieren zu können, wird zusätzlich ein Gen analysiert, welches in allen Zellen ungefähr gleich häufig vorkommt. In diesem Fall wurde dafür das Gen für die kleine ribosomale Untereinheit 18s verwendet. Für die qPCR zur Detektion des 18s-Gens wird das *Ribosomal RNA Control Reagents Set* (Life technologies) verwendet. Hierfür wurden pro Probe 12,5 µl TaqMan[®] 2x Universal PCR Master Mix, je 0,15 µl 18s-

Ribosomal Probe, 18s 5' Forward Primer und 18s 3' Reverse Primer (jeweils 10 µM) und 2,05 µl Wasser verwendet und das Volumen wurde für die Gesamtprobenzahl angepasst.

Im nächsten Schritt wurden dann in eine *MicroAmp Optical 96-Well reaction plate* (Applied Biosystems) 15 µl des vorbereiteten 18s-Primer-PCR-TaqMan®-Mix pro *well* vorgelegt und anschließend 10 µl der verdünnten cDNA (aus der oben genannten *Masterplate*) mithilfe einer Multikanalpipette in die *MicroAmp*-Platte hinzu pipettiert. In ein zusätzliches *well* wurden 15 µl 18s-Primer-PCR-Taqman®-Mix und 10 µl Wasser als Negativkontrolle pipettiert.

Die *MicroAmp*-Platte wurde nun mit einer Polyolefin-Folie (STARLAB) zugeklebt. Um die cDNA als auch den Primer-Mix im Boden der Platte zu sammeln, wurde diese für 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die qPCR wurde dann mittels QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und einem Programm zur Ermittlung der relativen Standardkurve und den hier passenden Farbstoffen („VIC (Reporter)“ und „Tamra (Quencher)“) durchgeführt.

Assay-on-Demand (AOD)

Bei Anwendung sogenannter TaqMan® Assay-on-Demand (AOD)-Primerpaare (Applied Biosystems) wurden pro Probe 10 µl TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix sowie 1 µl AOD Mix zusammen pipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu der oben beschriebenen 18s qPCR, jedoch wurden hier 11 µl AOD-Primer-Mix pro Probe und *well* in die *MicroAmp Optical 96-well reaction plate* vorgelegt. Hier wurden ebenfalls 10 µl (entsprechend 25 ng) der verdünnten cDNA verwendet. Das QuantStudio 6 PCR-System wurde hierbei auf den Farbstoff „FAM“ (ohne Quencher) eingestellt.

TaqMan®-Primer

Für TaqMan®-Primer, bestehend aus Vorwärts- und Rückwärts-Primern und einer Fluoreszenz-markierten „Sonde“ (*Probe*), wurden pro Probe 12,5 µl TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix, 0,75 µl Fluoreszenz-markierte „Sonde“ (*Probe*) (Konzentration: 10 µM) mit jeweils 0,6 µl Vorwärts-Primer und Rückwärts-Primer

(Konzentration: 45 µM) als auch 0,55 µl Wasser gemischt. Für diese qPCR wurden wiederum 15 µl des TaqMan®-Primer-Mix pro *well* in die qPCR-Platte vorgelegt und 10 µl der cDNA hinzugefügt. Das durchgeführte Programm war identisch zu dem der AOD-basierten qPCR.

2.6.3 SYBR® Green-Primer

Bei SYBR® Green-Primern wurden zunächst der Vorwärts-Primer und der Rückwärts-Primer gemischt und auf eine finale Konzentration von 2 µM verdünnt. Der fertige qPCR-SYBR®-Primer-Mix bestand dann pro Probe aus 12,5 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) und 2,5 µl Primer-Mix (Konzentration: 2 µM). Analog zur TaqMan®-basierten qPCR wurden hier wieder 15 µl des SYBR®-Primer-Mix in der qPCR-Platte vorgelegt und 10 µl der cDNA hinzu pipettiert. Das QuantStudio 6 PCR-System wurde hier auf den Farbstoff „SYBR“ (ohne Quencher) eingestellt.

2.6.4 Primersequenzen/Referenznummern

Die verwendeten Primersequenzen oder ihre Referenznummern sind in den Tabellen 3 bis 5 dargestellt.

	Gen	TaqMan®-Assay-Nummer
AOD	<i>LL-37</i>	Hs 01011708 m1
	<i>GM-CSF</i>	Hs 00171266_A1 CSF2
	<i>IL-17A</i>	Hs 99999082 m1 IL17A
	<i>IL-22</i>	Hs 00220924 m1 IL22
	<i>IL-26</i>	Hs 00218189 m1 IL26

Tabelle 3: Liste der TaqMan®-Assay-on-Demand-qPCR-Primersequenzen (Unternehmen: Applied Biosystems)

TaqMan®	Gen	hBD2
	Sequenz „Probe“	5' CCAGGTGTTTTTGGTGGTATAGGCGATCC 3'
	Sequenz vorwärts	5' CCTCTTCATATTCCTGATGCCTCT 3'
	Sequenz rückwärts	5' GGCTCCACTCTTAAGGCAGGT 3'

Tabelle 4: Liste der TaqMan®-qPCR-Primersequenzen für hBD2 (Unternehmen: Eurofins Genomics)

SYBR®	Gen		Sequenz vorwärts
	<i>S100A7</i>	v	5' AGACGTGATGACAAGATTGAC 3'
		r	5' TGTCCTTTTTCTCAAAGACGTC 3'
	<i>S100A8</i>	v	5' AGCTGTCTTTCAGAAGACCTGG 3'
		r	5' CCCTGTAGACGGCATGGAAA 3'
	<i>S100A9</i>	v	5' TCGGCTTTGACAGAGTGCAA 3'
		r	5' GCCCCAGCTTCACAGAGTAT 3'
	<i>OASL</i>	v	5' TGTGTCAGAAAACAGCTCAAAAA 3'
		r	5' GCAACGATGTCCCATCTGTA 3'
	<i>OAS2</i>	v	5' CTGGCAAAGAAGCAAAGGA 3'
		r	5' TTCCTGGTGTCTGCATTGTC 3'
	<i>ISG15</i>	v	5' GCGAACTCATCTTTGCCAGTA 3'
		r	5' CCAGCATCTTCACCGTCAG 3'
	<i>MX1</i>	v	5' AGAGAAGGTGAGAAGCTGATCC 3'
		r	5' TTCTTCCAGCTCCTTCTCTCTG 3'
	<i>IL-29</i>	v	5' TGGACCGTGGTCCTGGTGACT 3'
		r	5' CAGCTTGAGTGACTCTTCCAAGGC 3'
	<i>IFN-γ</i>	v	5' ACGTCTGCATCGTTTTGGGTT 3'
		r	5' GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA 3'
	<i>T-bet</i>	v	5' GGTAACATGCCAGGGAACAGGA 3'
		r	5' TGGTCTATTTTAGCTGGGTGATGTCTG 3'
	<i>RORc</i>	v	5' GACAGCACCGAGCCTCACGG 3'
		r	5' CGGAAGAAGCCCTTGCACCCC 3'
	<i>GATA3</i>	v	5' CCGGTCCAGCACAGAAGGCA 3'
		r	5' GGGGCCGTTCTGTCCGTTTC 3'

Tabelle 5: Liste der SYBR®-qPCR-Primersequenzen (Unternehmen: Eurofins Genomics).
v=vorwärts, r=rückwärts.

2.7 Durchflusszytometrie der T-Zellen

T-Zellen vom TH17-Zelltyp wurden in An- oder Abwesenheit von Apremilast mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert. Mit dem Zweck intrazelluläre Zytokine wie IL-17 oder IL-26 zu untersuchen, wurden Brefeldin A (Biolegend) und GolgiStop (BD Biosciences) 4 h vor Inkubationsende zu den Zellen hinzugefügt. Die T-Zellen wurden dann suspendiert, in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Durchflusszytometrie- (FACS) Puffer (PBS mit 4 % FCS und 1 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde 25 % humanes AB Serum zu den Proben hinzugefügt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle wie CD8 (PE, Klon: RPA-T8, BD Pharmingen), CD4 (PE-Cy7, Klon: OKT4, Biolegend) und Zombie

NIR (APC-Cy7; *life/dead marker*, Biolegend) in einem Volumen von 50 µl für 30 min auf Eis gefärbt. Nach der Inkubation wurden 500 µl FACS-Puffer hinzugefügt und die Proben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl 4 % Paraformaldehyd- (PFA) Lösung resuspendiert und bei 4°C für 15 min inkubiert. Um den Fixierungsprozess zu stoppen, wurden 500 µl FACS-Puffer hinzugefügt und wieder zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 200 µl FACS-Puffer gelöst und für bis zu 72 h bei 4°C gelagert, bevor die intrazelluläre Zytokin-Färbung durchgeführt wurde. Um intrazelluläre Zytokine zu färben, wurden die Zellen mithilfe von 1000 µl *Perm/Wash solution* (BD Biosciences) permeabilisiert. Die Proben wurden für 15 min bei RT inkubiert und anschließend wieder zentrifugiert. Antikörper gegen IL-17 (PerCP, Klon: 41802, R&DSystems) und IL-26 (APC, Klon: 11C31, USBiological) wurden dann in der *Perm/Wash solution* verdünnt, zu den Zellen zu einem finalen Volumen von 50 µl hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden weitere 500 µl *Perm/Wash solution* hinzugefügt und die Proben zentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mittels des Durchflusszytometers CytoflexS (Beckman Coulter) mit CytExpert Software analysiert.

2.8 Lymphozyten-Stimulation mit Varizellen-Antigen

2.8.1 Oberflächenmolekül CD69

Das Oberflächenmolekül der Nummer 69 des „*Cluster of Differentiation*“ (CD69) wird auch als das „*early human lymphocyte activation Antigen*“ bezeichnet. Dieses Antigen ist ein Oberflächen-Homodimer aus 28- und 32-kDa-Ketten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Das CD69-Antigen ist auf aktivierten T-, B-, NK-Lymphozyten und Thrombozyten vorhanden und die Expression steigt unter Aktivierung weiter an, bis nach 18 h der Höhepunkt erreicht ist. Um die Aktivierung der Lymphozyten zu analysieren wurde dann ein Fluoreszenzmarkierter anti-CD69-Antikörper bei der Durchflusszytometrie genutzt.

2.8.2 Lymphozyten-Stimulation

Zunächst wurden PBMC aus den vier mit Spenderblut gefüllten CPT-Röhrchen (BD Biosciences) isoliert wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Die Zellkonzentration wurde auf $5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in RPMI-Medium (mit 5 % humanem AB Serum) eingestellt.

In alle 1,5 ml Röhrchen wurden 200 μ l PBMC-Suspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen) gefüllt. Danach wurde DMSO bzw. Apremilast (finale Konzentration: 2 μ M oder 0,5 μ M) zu den PBMC hinzugefügt und für 45 min bei 37°C im Inkubator gelagert. Nun wurden die weiteren Stimulanzen oder Kontrollreagenzien hinzugegeben. Die Negativkontrolle war PBS und in die Positivkontrolle wurden 4 μ l anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper (BD Fastimmune™, BD Biosciences) gegeben. Des Weiteren gab es Bedingungen mit 1 μ M anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper sowie die Varizellen-Stimulation mit 10 μ l Varizella-Zoster-Virus Hüllglykoprotein E (VZV gE) (PepMix, JPT Solutions, Berlin, Deutschland) und bakterielle Stimulation mit LPS (finale Konzentration: 100 ng/ml) (Tabelle 6). Die Röhrchen wurden dann für 20 h bei 37°C inkubiert.

1	PBS (Negativ-Kontrolle)		
2	CD2/CD2R (Positiv-Kontrolle)	4 μ l	
3	DMSO		
4	Apremilast (2 μ M)		
5	Apremilast (0,5 μ M)		
6	CD2/CD2R low	1 μ l	
7		1 μ l	Apremilast (2 μ M)
8		1 μ l	Apremilast (0,5 μ M)
9	VZV gE	10 μ g/ml	
10		10 μ g/ml	Apremilast (2 μ M)
11	LPS	100 ng/ml	
12		100 ng/ml	Apremilast (2 μ M)
13		100 ng/ml	Apremilast (0,5 μ M)

Tabelle 6: Stimulationsbedingungen für die Lymphozyten-Aktivierung.

2.8.3 Durchflusszytometrie der Varizella-Antigen-stimulierten Lymphozyten

Nach der Inkubationsperiode wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in FACS-Puffer resuspendiert. Analog zu Kapitel 2.7 wurde Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Lymphozyten wurden mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD3 (APC, Klon: UCHT1, Biolegend) und CD69 (PE, Klon: FN50, Biolegend) zusammen mit dem *Life/Dead* Marker Zombie NIR

(APC-Cy7, Biolegend) und einer Isotypenkontrolle gefärbt und wie in Kapitel 2.7 beschrieben analysiert.

2.9 Interferon-gamma-release-assay

Der Interferon-Gamma-Release-Assay (IGRA, QuantiFERON® Test, Qiagen) wird standardmäßig zum laborchemischen Nachweis einer (stattgehabten) Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* eingesetzt und wurde im Folgenden etwas umgewandelt, um die Effekte von Apremilast zu untersuchen.

2.9.1 Standardprinzip

Im ersten Schritt wird Blut in Plasmaröhrchen für 16 bis 24 h bei 37°C inkubiert, die mit verschiedenen Tuberkulose-Antigenen beschichtet sind. Danach wird Plasma gewonnen und die Konzentration des enthaltenen Interferons mittels ELISA bestimmt.

Der IGRA enthält vier EDTA-Plasmaröhrchen: ein Nil-Röhrchen, ein Mitogen-Röhrchen, ein TB1-Röhrchen und ein TB2-Röhrchen. Das Mitogen-Röhrchen dient als Positivkontrolle, während das Nil-Röhrchen die Negativkontrolle ist. Nach der Inkubationszeit wird das Blut zentrifugiert, das Plasma abgenommen und die Menge des IFN- γ mittels ELISA gemessen. Ein Test wird als positiv für eine IFN- γ -Antwort auf das TB-Antigen-Röhrchen gewertet, wenn er signifikant über dem Nil IFN- γ -Wert (gemessen in internationalen Einheiten pro ml (IE/ml)) liegt. Da die Nil-Probe als Negativkontrolle unspezifisches IFN- γ im Blut darstellt, wird das IFN- γ -Level des Nil-Röhrchens vom IFN- γ -Level des TB-Antigen-Röhrchens und des Mitogen-Röhrchens subtrahiert.

2.9.2 Durchführung

Benötigt wurden zweimal 5 ml Blut in Lithium-Heparin-Röhrchen. In eines der Röhrchen wurde anschließend 10 μ l Apremilast (finale Konzentration: 2 μ M) hinzugefügt, während das zweite Röhrchen unbehandelt blieb. Nach einer Inkubationszeit von 45 bis 60 min bei 37°C wurde jedes Röhrchen in ein Set des QuantiFERON® Tests aufgeteilt, das heißt je 1 ml wurde in eines der vier QuantiFERON®-Röhrchen (Mitogen, Nil, TB1, TB2) pipettiert, invertiert und für 24 h

bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhren für 15 min bei RT bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde vorsichtig abgenommen und bei -20°C bis zur Durchführung des ELISAs eingefroren.

Nachdem der IFN- γ -Konzentrationsstandard auf 8,0 IE/ml eingestellt worden war, wurde im Folgenden eine Verdünnungsreihe von IFN- γ in *Green Diluent* (GD) hergestellt. Hierfür wurden vier 1,5 ml-Reaktionsröhren mit 150 μ l GD befüllt. Das erste Röhren enthielt nach Zugabe von 150 μ l IFN- γ -Standard eine Konzentration von 4 IE/ml. In das zweite und dritte Röhren wurde durch Zugabe von jeweils 50 μ l aus dem vorherigen Röhren eine Konzentration von 1 IE/ml und 0,25 IE/ml erreicht. Das vierte und letzte Röhren war die Negativkontrolle und enthielt GD und somit eine IFN- γ -Konzentration von 0 IE/ml. Der nächste Schritt bestand in der Herstellung des *working strength conjugate*. Danach wurden 50 μ l *working strength conjugate* in die benötigten *wells* der ELISA-Platte pipettiert. Hinzu kamen anschließend weitere 50 μ l Plasma oder 50 μ l der Standardverdünnungsreihe in die jeweiligen Ansätze. Die ELISA-Platte wurde anschließend für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *wells* sechsmal mit 400 μ l des *wash buffer* gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l der *Enzyme Substrate Solution* in jedes *well* gegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nun wurden 50 μ l der *Enzyme Stopping Solution* in jedes *well* gegeben. Die OD wurde bei 450 nm im TECAN Plattenlesegerät gemessen.

2.10 Auswertung und Statistik

Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde die Statistik-Software GraphPad Prism in der Version 5.03 verwendet. Bei den Abbildungen handelt es sich um Balkendiagramme, die den Mittelwert + Standardfehler (*Mean with SEM*) darstellen. Bei den Darstellungen der Zellvitalitätsassays wurde die Lebensfähigkeit der Zellen in Prozent angegeben. Hierbei wurde die Positivkontrolle (Zellen behandelt mit Zellkulturmedium) jeweils auf 100 % gesetzt. Bei den Grafiken der qPCRs wurde die Genexpression der Gene im Verhältnis zur Genexpression des 18S in relativen Einheiten dargestellt. Bei QuantiFERON® Assays wurde die mithilfe des Standards berechnete Menge IFN- γ abgebildet. Bei der IGRA-Auswertung sowie der Auswertung der FACS-Färbung der T-Zellen wurde in der Grafik entweder

die Anzahl der spezifischen Zellen in Prozent oder der Änderungsfaktor der Zellen dargestellt, indem die Mediumkontrolle auf 1 gesetzt wurde. Für die weitere statistische Auswertung wurden verschiedene statistische Tests angewendet. Da bei den Untersuchungen der Stichprobenumfang immer kleiner als 10 war, konnte keine Überprüfung der Normalverteilung und somit kein *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* durchgeführt werden. Daher wurde hauptsächlich der *Mann-Whitney-Test* verwendet. Für alle Darstellungen, bei denen die Kontrolle auf einen bestimmten Wert gesetzt wurde, wurde der *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* genutzt. Mithilfe der genannten statistischen Tests wurde der p-Wert (Signifikanz) ermittelt, der die Wahrscheinlichkeit (*probability*) darstellt, mit welcher das Ergebnis falsch positiv ist. Hierbei wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ mit *, ein p-Wert $\leq 0,01$ mit ** und ein p-Wert $\leq 0,001$ mit *** in der Abbildung dargestellt. Ein p-Wert $> 0,05$ wurde als nicht signifikant betrachtet und daher nicht dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Apremilast hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen

Im Rahmen einer ersten Voruntersuchung wurde überprüft, ob Apremilast einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit/Vitalität der Keratinozyten, Synoviozyten und der CD4⁺-T-Zellen *in vitro* hat. Da Apremilast in DMSO gelöst ist, diente DMSO als Kontrolle.

Für die primären Keratinozyten wurde der MTT-Assay verwendet (beschrieben in Kapitel 2.3.1). Die Ergebnisse sind in Abb. 8A dargestellt. Auf der x-Achse sind zunächst reines Medium und 5 % DMSO aufgezeichnet als Negativ- und Positivkontrolle. Daneben sind jeweils Apremilast und DMSO in den Konzentrationen 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM und 0,05 µM aufgeführt. Die y-Achse zeigt die Zellvitalität in Prozent (%). Das Medium wurde auf eine Zellvitalität von 100 % gesetzt. Die Negativkontrolle 5 % DMSO zeigt eine Vitalität von etwa 25 %. Die Keratinozyten unter Apremilast- und DMSO-Behandlung zeigen keine nennenswerten Abweichungen zur Mediumkontrolle. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (*Standard error of the mean*, SEM) angegeben.

Für die Vitalitätsprüfung der Synoviozyten und CD4⁺-T-Zellen wurde CellTiter Glo[®] verwendet (Kapitel 2.3.2). Die graphische Darstellung für die Synoviozyten (Abb. 8B) und die CD4⁺-T-Zellen (Abb. 8C) erfolgte ähnlich der für Keratinozyten. Hier wurde jedoch zytotoxisches 1 % Triton als Negativkontrolle verwendet, da die Zellen relativ resistent gegenüber 5 % DMSO waren. Die Zellvitalität in unbehandelten Zellen (Mediumkontrolle) wurde auf 100 % gesetzt. Die Zellvitalität bei Triton geht gegen 0 %. Die Gegenwart von Apremilast (als auch DMSO) hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Synoviozyten und CD4⁺-T-Zellen.

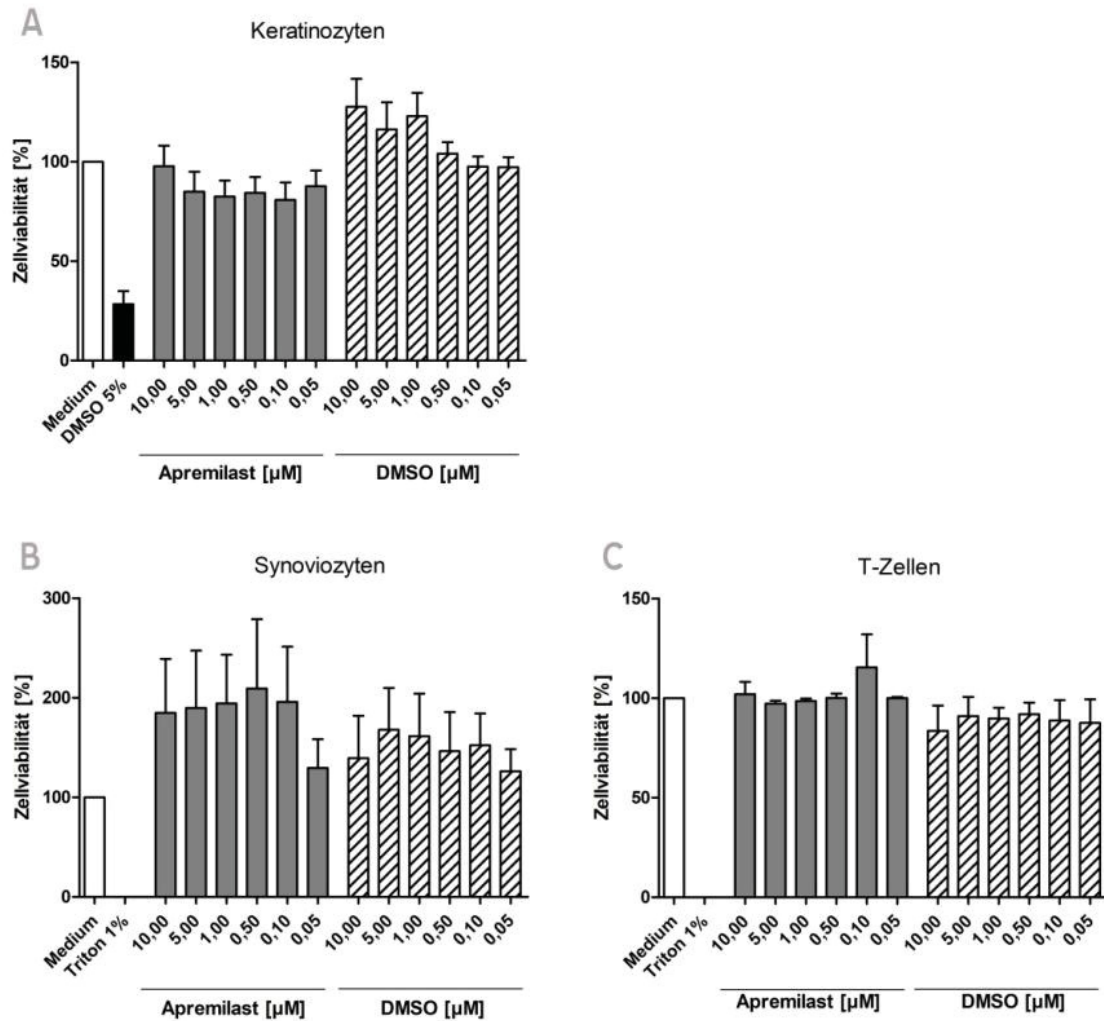


Abb. 8: MTT-Assay für Keratinozyten und CellTiter Glo® für Synoviozyten und T-Zellen zur Untersuchung der Zellviabilität. Keratinozyten (A, n=7), Synoviozyten (B) und T-Zellen (C) wurden mit einer Verdünnungsreihe von Apremilast (10 μM, 5 μM, 1 μM, 0,5 μM, 0,1 μM und 0,05 μM) und DMSO in den gleichen Konzentrationen behandelt. Zellkulturmedium und 5 % DMSO (bei Keratinozyten) oder 1 % Triton (bei Synoviozyten/T-Zellen) dienen als Kontrollen. Die Zellviabilität wurde in % angegeben und der Medium-Wert auf 100 % festgelegt. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3.2 Effekte von Apremilast auf die antimikrobielle Abwehr von Keratinozyten- und Synoviozytenzellkulturen

Mithilfe von qPCRs wurde nun getestet, ob sich die Genexpression von AMP in Keratinozyten und Synoviozyten unter Einfluss von Apremilast ändert. Die jeweiligen Zellen wurden zunächst mit Apremilast und verschiedenen Zytokinen und bakteriellen Bestandteilen behandelt (Kapitel 2.2.1). Es wurde die Genexpression der antimikrobiellen Gene *S100A7*, *S100A8*, *S100A9*, *HBD2* und *LL37* getestet.

3.2.1 Apremilast hat keinen Einfluss auf die Expression von AMP in Keratinozyten

Beispielhaft für alle getesteten AMP wurde die Expression von *S100A7* in Keratinozyten in Abb. 9 abgebildet. Auf der y-Achse befindet sich das getestete Gen (*S100A7*) angegeben in relativen Einheiten (RE). Auf der x-Achse sind in Abb. 9A die Kontrollen aufgetragen (Zellkulturmedium (Kontrolle), DMSO, Apremilast (2 μ M) und Apremilast (0,5 μ M)). Die weiteren Teile der Abbildung zeigen jeweils erneut die Kontrolle sowie die Stimulation mit IL-17 (Abb. 9B), IL-22 (Abb. 9C), LPS (Abb. 9D), LTA (Abb. 9E), LAM Mtb (Abb. 9F) und ESAT-6/CFP-10 (Abb. 9G). Apremilast zeigt eine Tendenz zur erhöhten Genexpression von *S100A7* (Abb. 9A). Weiter zeigt sich, dass die Behandlung der Keratinozyten mit IL-17 (Abb. 9B) die Genexpression von *S100A7* signifikant erhöht. Durch Zugabe von Apremilast sinkt diese jedoch wieder. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant. Auch die Gabe von ESAT-6/CFP-10 (Abb. 9G) scheint eine leicht erhöhte Genexpression auszulösen. Die anderen getesteten Stimulanzen IL-22, LPS und LTA scheinen die Genexpression von *S100A7* nicht zu beeinflussen. Für LAM Mtb wirkt es sogar so, als reduziere es diese. In all diesen Fällen zeigt die Zugabe von Apremilast einen Trend zur Herunterregulation der Genexpression (Abb. 9E, 9G) oder keinen signifikanten Einfluss (Abb. 9C, 9D, 9F).

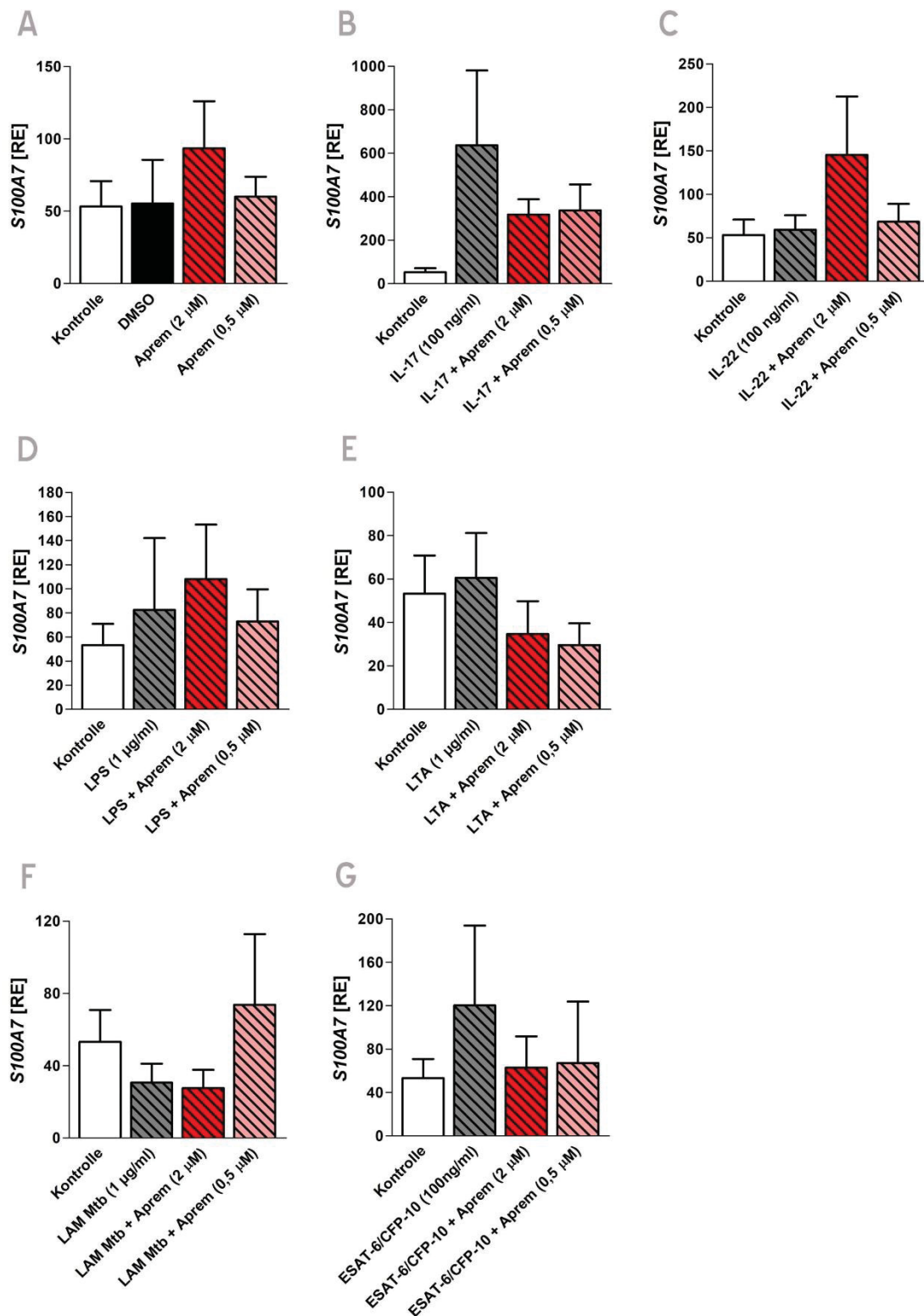


Abb. 9: S100A7-Genexpression in Keratinozyten nach Stimulation mit Apremilast und Zytokinen sowie antimikrobiellen Komponenten. Keratinozyten (n=7) wurden für 60 min mit Apremilast (Aprem; 0,5 oder 2 μ M) vorbehandelt bevor 100 ng/ml IL-17 (B), 100 ng/ml IL-22 (C), 100 ng/ml LPS (D), 1 μ g/ml LTA (E), 1 μ g/ml LAM Mtb (F) und 1 μ l/ml ESAT-6/CFP-10 (G) hinzugegeben und für 24 h inkubiert wurden. A zeigt die Kontrollwerte bestehend aus Medium (Kontrolle), DMSO und Apremilast. Dargestellt ist die Genexpressionsanalyse des S100A7 in relativen Einheiten (RE) als Mittelwert + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Tests.

In Tabelle 7 sind alle getesteten Gene und deren Signifikanzen dargestellt. Getestete Bedingungen, die bei der statistischen Analyse keine Signifikanz ergeben haben, sind nicht dargestellt. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Gene von AMP in Keratinozyten durch verschiedene Zytokine reguliert werden konnten. Die vorhergehende Zugabe von Apremilast hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der getesteten AMP.

Gen	Signifikanz zwischen:	P	Gen	Signifikanz zwischen:	P
<i>S100A7</i>	M -- IL-17	**	<i>S100A8</i>	M -- IL-17	**
	M -- IL-17 + A2	**		M -- IL-17 + A2	*
	M -- IL-17 + A0,5	**		M -- IL-17 + A0,5	*
				M -- IFN- γ	*
				M -- IFN- γ + A2	*
				M -- IFN- γ + A0,5	*
<i>S100A9</i>	M -- IL-17	**	<i>LL37</i>	M -- IL-17 + A2	*
	M -- IL-17 + A2	*		M -- IL-17 + A0,5	*
	M -- IL-17 + A0,5	**		M -- IFN- γ	**
	M -- IFN- γ	*		M -- IFN- γ + A2	*
	M -- IFN- γ + A2	*		M -- IFN- γ + A0,5	*
	M -- IFN- γ + A0,5	*			
<i>HBD2</i>	M -- IL-17	**			
	M -- IL-17 + A2	**			
	M -- IL-17 + A0,5	**			

Tabelle 7: Liste aller getesteten antimikrobiellen Gene in Keratinozyten inklusive Signifikanzen. * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; M = Medium; A2 = Apremilast (2 μ M); A0,5 = Apremilast (0,5 μ M)

3.2.2 Apremilast hat keinen Einfluss auf die Expression von AMP in Synoviozyten

Analog zu den Keratinozyten wurde auch für die Synoviozyten die Genexpressionsanalyse für die antimikrobiellen Effekte beispielhaft anhand des *S100A7* graphisch dargestellt (Abb. 10). Anders als bei den Keratinozyten ist hier die Tendenz zu erkennen, dass Apremilast alleine die Genexpression des *S100A7* reduziert. Die Zugabe von IL-17 (Abb. 10B) sowie von LTA (Abb. 10E) lässt einen hochregulierenden Einfluss auf die *S100A7*-Genexpression erkennen. IL-22 (Abb. 10C), LPS (Abb. 10D), LAM Mtb (Abb. 10F) und ESAT-6/CFP-10 (Abb. 10G) scheinen die Genexpression nicht zu beeinflussen. Es ist zu erkennen, dass Apremilast auch bei den Synoviozyten die Genexpression nicht signifikant

beeinflusst (Abb. 10B, 10D, 10E, 10F) oder tendenziell senkt (Abb. 10B, 10C, 10F, 10G).

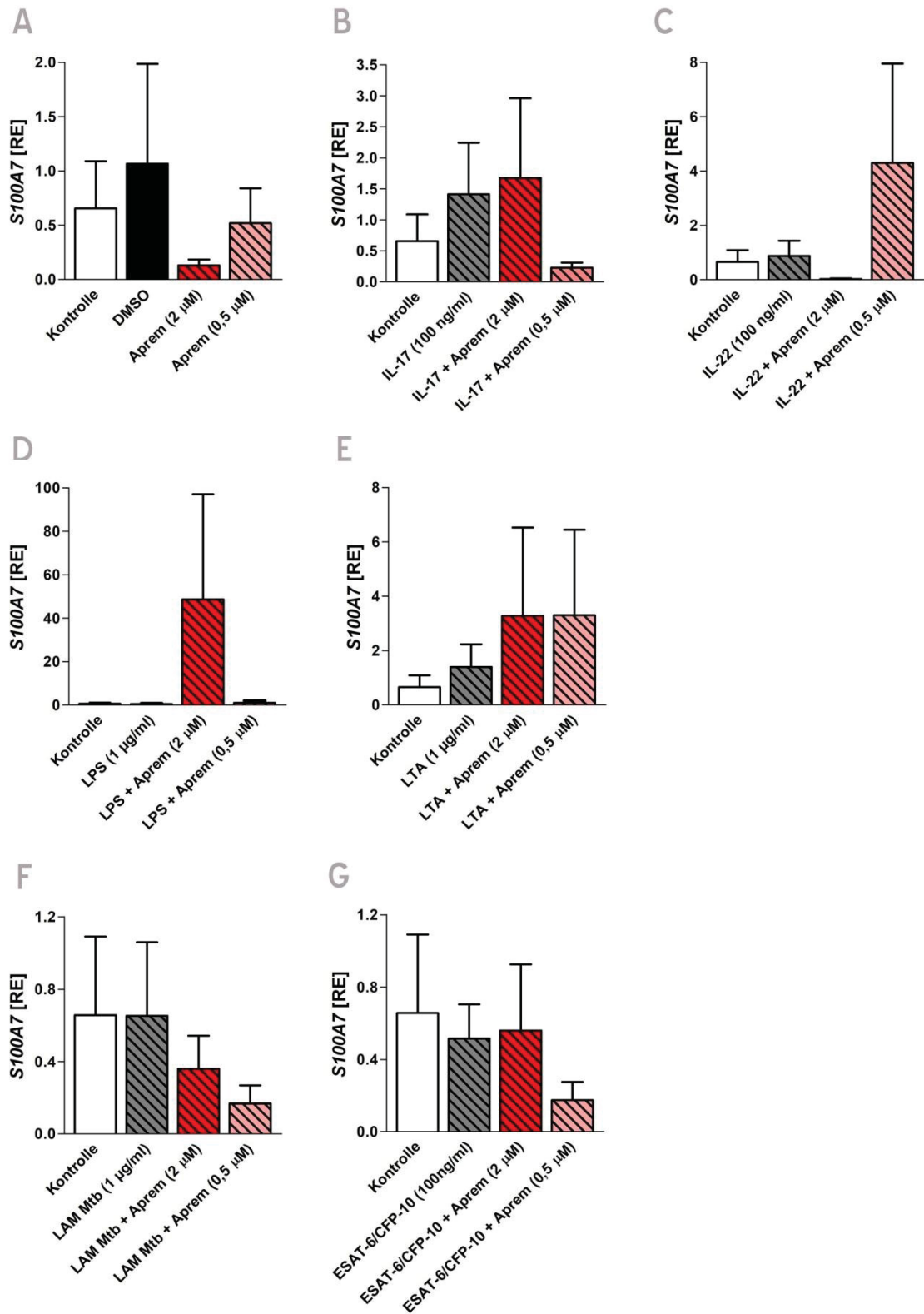


Abb. 10: *S100A7*-Genexpression in Synoviozyten nach Stimulation mit Apremilast. Synoviozyten (n=9) wurden für 60 min mit Apremilast (Aprem) vorbehandelt bevor 100 ng/ml IL-17 (B), 100 ng/ml IL-22 (C), 100 ng/ml LPS (D), 1 μ g/ml LTA (E), 1 μ g/ml LAM Mtb (F) und 1 μ g/ml ESAT-6/CFP-10 (G) hinzugegeben und für 24 h inkubiert wurden. A zeigt die Kontrollwerte bestehend aus Zellkulturmedium (Kontrolle), DMSO und Apremilast allein. Dargestellt ist das Gen *S100A7* in relativen Einheiten (RE) als Mittelwert + SEM, statistisch analysiert mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

Neben *S100A7* wurde auch noch die Expression des *LL37* in den Synoviozyten in Gegenwart von Apremilast untersucht. Die Ergebnisse lieferten keinerlei signifikante Ergebnisse und wurden daher nicht graphisch oder tabellarisch dargestellt.

3.3 Effekt von Apremilast auf antivirale Peptide in Keratinozyten und Synoviozyten

Nach den AMP sollten nun antivirale Peptide (AVP) in Keratinozyten und Synoviozyten untersucht werden. Für die Untersuchung der Genexpression der AVP in Gegenwart von Apremilast wurden wie bei den AMP qPCRs durchgeführt. Auch hier wurden Keratinozyten und Synoviozyten mit Apremilast (2 μ M und 0,5 μ M) vorbehandelt und anschließend verschiedene Zytokine hinzugegeben. Auch VZV Vaccine, VZV gE und VZV IE63 wurde auf die Zellen gegeben. Es wurde die Genexpression der antiviralen Gene *IL29*, *MX1*, *OASL*, *OAS2* und *ISG15* untersucht.

3.3.1 Apremilast beeinflusst die Expression von AVP in Keratinozyten nicht

Der Effekt des Apremilast auf die AVP wurde hier am Beispiel des *OASL* dargestellt. In Abb. 11A sind erneut die Kontrolle bestehend aus Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze, DMSO und Apremilast in den zwei Konzentrationen 2 μ M und 0,5 μ M dargestellt. Die Zugabe von Apremilast zeigt eine Tendenz zur Hochregulation des *OASL* (Abb. 11A). Mit Ausnahme des VZV IE63 (Abb. 11F), scheinen alle getesteten Bedingungen, also IFN- γ (Abb. 11B), IL-29 (Abb. 11C), VZV Vaccine (Abb. 11D) und VZV gE (Abb. 11E) die Genexpression von *OASL* hoch zu regulieren. Bei Stimulation mit IFN- γ und IL-29 ist diese Hochregulation signifikant. Die vorhergehende Zugabe von Apremilast lässt kein einheitliches Bild erkennen, da es teils zur Herunterregulation und teils zur Hochregulation kommt.

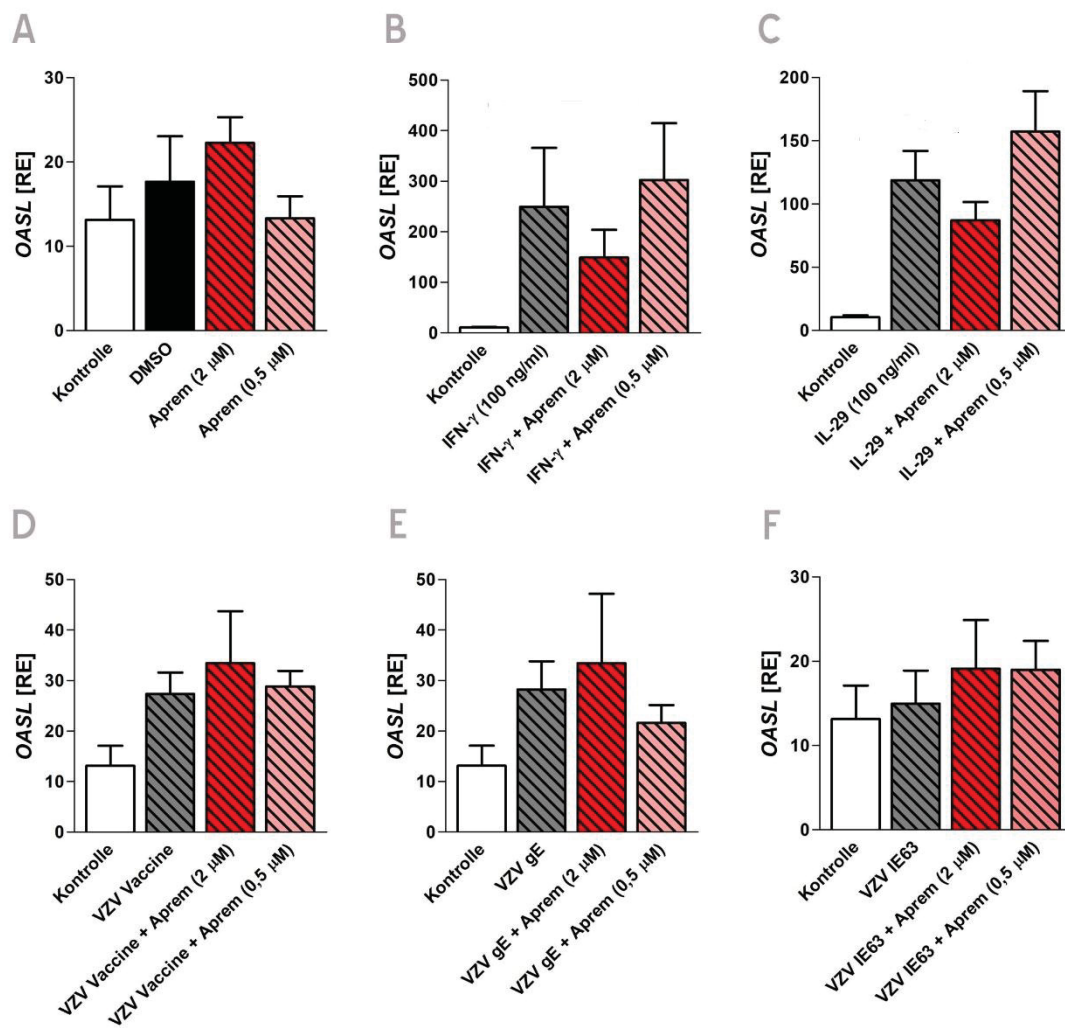


Abb. 11: Expression des Gens *OASL* in Keratinozyten nach Stimulation mit Apremilast und Zytokinen sowie antiviralen Komponenten. Keratinozyten (n=7) wurden für 60 min mit Apremilast (Aprem) vorbehandelt bevor 100 ng/ml IFN- γ (B), 100 ng/ml IL-29 (C), 1 μ g/ml VZV Vaccine (D), 1 μ g/ml VZV gE (E) und 1 μ g/ml VZV IE63 (F) hinzugegeben und für 24 h inkubiert wurden. A zeigt die Kontrollen allein, bestehend aus Medium (Kontrolle), DMSO und Apremilast. Dargestellt ist die Genexpression des *OASL* in relativen Einheiten (RE) als Mittelwert + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

OASL sowie alle weiteren getesteten Gene mit Signifikanzen sind in Tabelle 8 gezeigt. Auch hier lässt sich abschließend sagen, dass Apremilast die Expression von AVP in Keratinozyten nicht signifikant beeinflusst.

Gen	Signifikanz zwischen:	P	Gen	Signifikanz zwischen:	P
<i>MX1</i>	M -- IFN- γ	*	<i>OAS2</i>	M -- IFN- γ	*
	M -- IFN- γ + A2	*		M -- IFN- γ + A0,5	*
	M -- IFN- γ + A0,5	*		M -- IL-29	**
	M -- IL-29	***		M -- IL-29 + A2	**
	M -- IL-29 + A2	**		M -- IL-29 + A0,5	***
	M -- IL-29 + A0,5	***			
<i>OASL</i>	M -- LPS + A2	*	<i>ISG15</i>	M -- IFN- γ	**
	M -- IFN- γ	***		M -- IFN- γ + A2	*
	M -- IFN- γ + A2	**		M -- IFN- γ + A0,5	**
	M -- IFN- γ + A0,5	***		M -- IL-29	***
	M -- IL-29	***		M -- IL-29 + A2	***
	M -- IL-29 + A2	***		M -- IL-29 + A0,5	***
	M -- IL-29 + A0,5	***			
	LAM Mtb -- LAM Mtb + A2	*			
<i>IL29</i>	M -- IFN- γ	*			
	M -- IFN- γ + A2	*			
	M -- IFN- γ + A0,5	*			
	M -- IL-29 + A2	*			

Tabelle 8: Liste aller getesteten antiviralen Gene in Keratinozyten inklusive Signifikanzen. * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$; M = Medium; A2 = Apremilast (2 μM); A0,5 = Apremilast (0,5 μM)

3.3.2 Apremilast beeinflusst die Expression von AVP in Synoviozyten nicht

Exemplarisch ist bei den Synoviozyten die Genexpression von *OAS2* dargestellt. Wie auch schon bei den AMP (Kapitel 3.2.2) zeigt Apremilast alleine eher eine hemmende Wirkung auf die Genexpression, hier von *OAS2*. Die getesteten antiviralen Zytokine IFN- γ (Abb. 12B) und IL-29 (Abb. 12C) führen erwartungsgemäß zu einer Hochregulation der Genexpression von *OAS2*, die bei IFN- γ signifikant ist. Das Hinzufügen von Apremilast zeigt in diesem Falle einen Trend zur Verstärkung dieser hochregulierenden Wirkung.

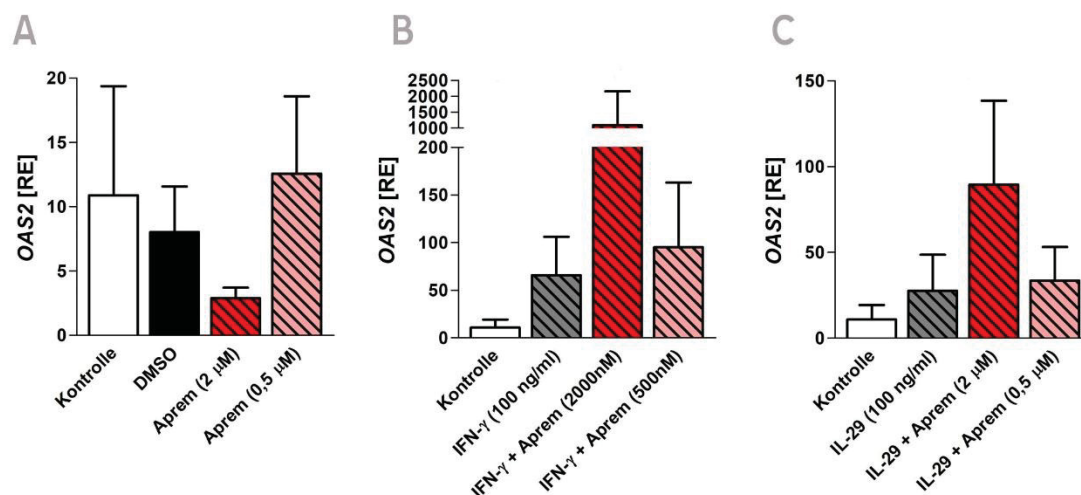


Abb. 12: Synoviale OAS2-Expression nach Stimulation mit Apremilast in Gegenwart von IFN- γ oder IL-29. Synoviozyten (n=9) wurden für 60 min mit Apremilast (Aprem) vorbehandelt bevor 100 ng/ml IFN- γ (B) oder 100 ng/ml IL-29 (C) für 24 h hinzugegeben und inkubiert wurden. Die Kontrollen bestehen aus Medium (Kontrolle), DMSO und Apremilast (A). Das Gen OAS2 ist in relativen Einheiten (RE) als Mittelwert + SEM dargestellt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde zur statistischen Auswertung angewandt.

Des Weiteren wurden auch die AVP *MX1* und *ISG15* unter Apremilast auf Synoviozyten getestet. Diese beiden Gene wurden zusammen mit *OAS2* tabellarisch in Tabelle 9 dargestellt.

Gen	Signifikanz zwischen:	P	Gen	Signifikanz zwischen:	P
<i>MX1</i>	M -- LPS	*	<i>OAS2</i>	M -- LPS	**
	M -- LPS + A2	*		M -- LPS + A2	*
	M -- LPS + A0,5	*		M -- LPS + A0,5	*
	M -- IFN- γ	*		M -- IFN- γ	*
	M -- IFN- γ + A2	*		M -- IFN- γ + A2	*
				M -- IFN- γ + A0,5	*
				M -- IL-29 + A2	*
				M -- IL-29 + A0,5	*
<i>ISG15</i>	M -- LPS	**			
	M -- LPS + A2	*			
	M -- LPS + A0,5	*			
	M -- IFN- γ	*			
	M -- IFN- γ + A2	*			
	M -- IFN- γ + A0,5	*			

Tabelle 9: Liste aller getesteten antiviralen Gene in Synoviozyten inklusive Signifikanzen. * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; M = Medium; A2 = Apremilast (2 µM); A0,5 = Apremilast (0,5 µM)

3.4 Auswirkung von Apremilast auf die Differenzierung von T-Zellen

Nach den Untersuchungen mit Keratinozyten und Synoviozyten sollte nun auch die Genexpression von differenzierten CD4⁺-T-Zellen unter Apremilast untersucht werden. Ziel war es herauszufinden, inwieweit die T-Zellen beeinflusst werden, wenn sie während des Differenzierungsprozesses zu T_H17-Zellen mit Apremilast behandelt wurden. Zunächst wurden naive CD4⁺-T-Zellen mit TGF-β1, IL-6, IL-23, und IL-2 sowie mit oder ohne Apremilast stimuliert, damit sich die naiven T-Helferzellen zu T_H17-Zellen differenzieren (Kapitel 2.2.3). Bei den anschließenden qPCRs wurden die Gene *IFNG*, *TBET*, *IL17A*, *IL22*, *RORC*, *IL26*, *GMCSF* und *GATA3* getestet. Unter Apremilast zeigen die Genexpressionen von *GATA3* (Abb. 13A), *GMCSF* (Abb. 13B), *IL17A* (Abb. 13D), *RORC* (Abb. 13G) und *TBET* (Abb. 13H) einen Trend zur Hochregulation. Beide Konzentrationen (2 μM und 0,5 μM) scheinen hier einen ähnlichen Einfluss zu haben. Die Genexpression von *IFNG* (Abb. 13C) und *IL26* (Abb. 13F) wird durch Apremilast nicht beeinflusst.

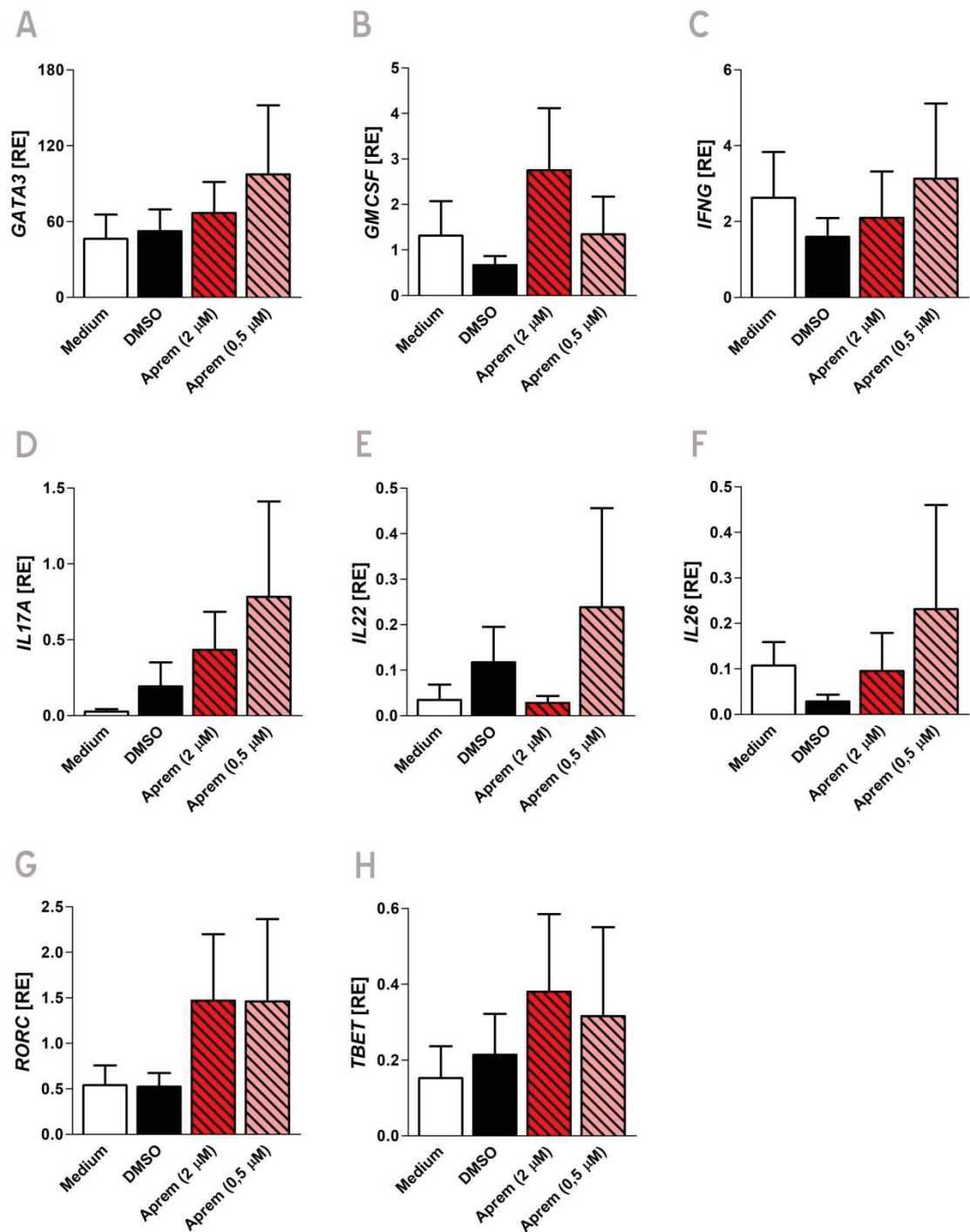


Abb. 13: Genexpression in T-Zellen nach Differenzierung zu T_H17 -Zellen. Naive $CD4^+$ -T-Zellen ($n=6$) wurden mithilfe des *Human T Cell Activation/Expansion Kits* aktiviert und für 30 min mit Apremilast (Aprem) vorbehandelt bevor TGF- β 1, IL-6 und IL-23 hinzugefügt wurden und die Zellen für 3 d inkubiert wurden. Nun wurde IL-2 hinzugefügt und die Zellen für weitere 4 d inkubiert. Es wurde die Genexpression von GATA3 (A), GMCSF (B), IFNG (C), IL17A (D), IL22 (E), IL26 (F), RORC (G) und TBET (H) gemessen. Die Genexpression ist in RE als Mittelwert + SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Tests.

Weiterhin sollte die Proteinsekretion von IL-17 und IL-26 in T_H17 -Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden. Die Proteinsekretion von IL-17 (Abb. 14A)

zeigt bei Zugabe von Apremilast einen Trend zur Hochregulation. IL-26 (Abb. 14B) jedoch scheint unter Apremilast-Einfluss reduziert sekretiert zu werden. Zusammengefasst ergeben sich keinerlei Hinweise, dass Apremilast die T_H17 -Zelldifferenzierung beeinflusst.

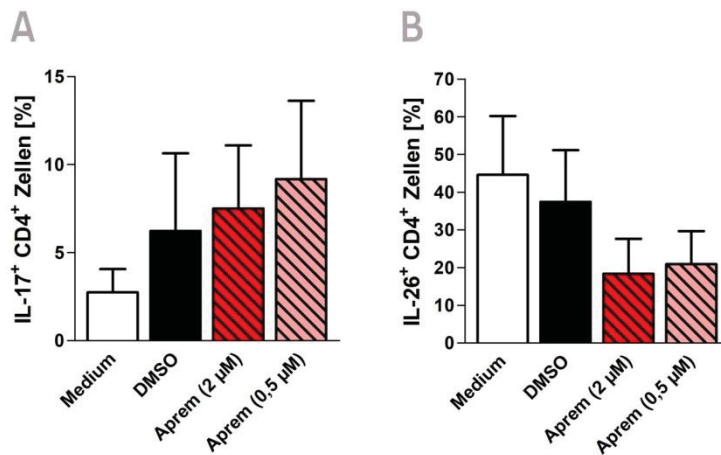


Abb. 14: Expression der Zytokine IL-17 und IL-26 in CD4⁺-T-Zellen. CD4⁺-T-Zellen (n=5) wurden mit Apremilast (Aprem) und DMSO behandelt und für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem CD4-Antikörper markiert und permeabilisiert, um die intrazellulären Zytokine IL-17 und IL-26 anzufärben und mittels Durchflusszytometrie zu analysieren. Die Anzahl der IL-17⁺ CD4⁺-T-Zellen (A) und der IL-26⁺ CD4⁺-T-Zellen (B) ist in % angegeben als Mittelwert + SEM.

3.5 Effekte von T-Zell-Überständen auf Keratinozyten und Synoviozyten

Im nächsten Schritt wurde die Genexpression von AMP und AVP in Keratinozyten und Synoviozyten untersucht, nachdem diese mit T-Zell-Überständen behandelt worden waren. Diese Überstände wurden in den Experimenten des vorherigen Kapitels generiert und sind von T-Zellen, deren Differenzierung in Gegenwart von Apremilast stattfand. Es wurden qPCRs zur Bestimmung der Genexpression der AMP *S100A7* und *LL37* sowie der AVP *ISG15* und *MX1* durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, inwieweit die AMP bzw. AVP in Zielzellen (wie Keratinozyten und Synoviozyten) beeinflusst werden, wenn T-Zellen während ihrer Differenzierung zu T_H17 -Zellen mit Apremilast behandelt wurden.

3.5.1 Leichte Induktion von *S100A7* in Keratinozyten durch T-Zell-Überstand

Leicht erhöht stellt sich die Genexpression von *S100A7* (Abb. 15A) in Keratinozyten dar, nachdem T-Zell-Überstand mit Apremilast zugegeben wurde. Das *LL37* (Abb. 15B) wird nicht verändert exprimiert.

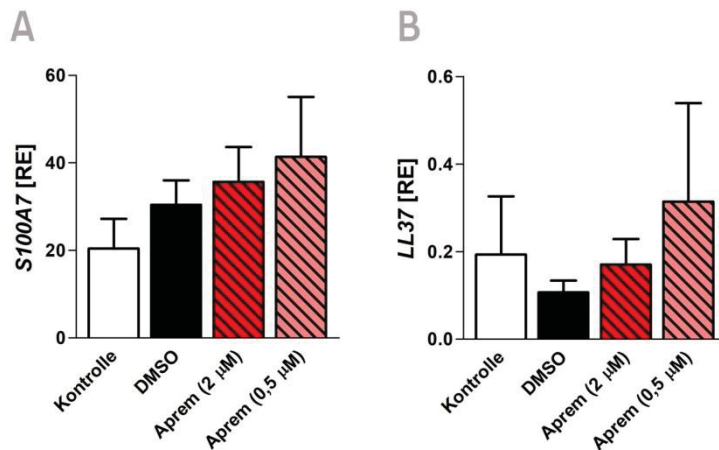


Abb. 15: Expression der Gene *S100A7* und *LL37* nach Behandlung mit Apremilast-enthaltenden T-Zell-Überständen in Keratinozyten. Keratinozyten (n=9) wurden mit T-Zellüberständen verschiedener Bedingungen (Medium, DMSO und Apremilast (Aprem; 2 µM und 0,5 µM)) behandelt und für 24 h inkubiert. Gemessen wurde die Genexpression für *S100A7* (A) und *LL37* (B), angegeben in RE als Mittelwert + SEM.

Betrachtet man die Genexpression der AVP *ISG15* (Abb. 16A) und *MX1* (Abb. 16B), erkennt man, ähnlich zu den oben getesteten AMP, keinen Einfluss des Apremilast.

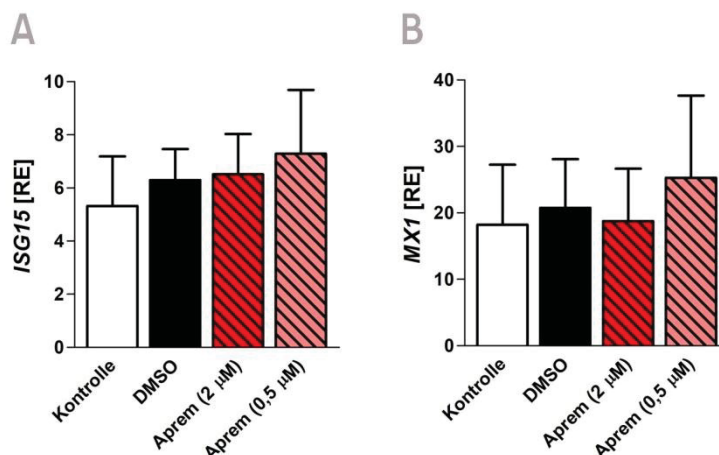


Abb. 16: Genexpression antiviraler Peptide nach Behandlung mit T-Zell-Überständen in Keratinozyten. Keratinozyten (n=9) wurden mit T-Zellüberständen verschiedener Bedingungen (Medium, DMSO und Apremilast (Aprem; 2 µM und 0,5 µM)) behandelt und für 24 h inkubiert. Dargestellt ist die Genexpression von *ISG15* (A) und *MX1* (B) in RE als Mittelwert + SEM.

3.5.2 Überstände von Apremilast-behandelten T-Zellen reduzieren AVP Genexpression in Synoviozyten

Die Genexpression von *S100A7* (Abb. 17A) und *LL37* (Abb. 17B) in Synoviozyten scheint in Anwesenheit von Apremilast in T-Zell-Überständen leicht herunterreguliert zu sein, jedoch lassen Ausreißer hier kein eindeutiges Bild zu. Die relative Expression ist bei diesen Genen so gering, dass eine biologische Relevanz dieser Ergebnisse wahrscheinlich nicht besteht.

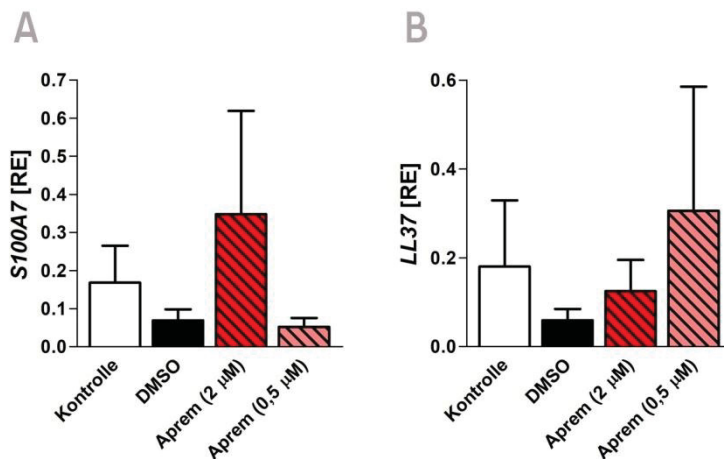


Abb. 17: Analyse der antimikrobiellen Peptide *S100A7* und *LL37* nach Behandlung mit T-Zell-Überständen in Synoviozyten. Synoviozyten (n=8) wurden mit T-Zellüberständen verschiedener Bedingungen (Medium, DMSO und Apremilast (Aprem; 2 µM und 0,5 µM)) behandelt und für 24 h inkubiert. Gemessen wurde die Genexpression für *S100A7* (A) und *LL37* (B), angegeben in RE als Mittelwert + SEM.

Die AVP *ISG15* (Abb. 18A) und *MX1* (Abb. 18B) zeigen deutlicher und homogener die Tendenz einer verminderten Genexpression bei Behandlung mit T-Zell-Überstand inklusive Apremilast.

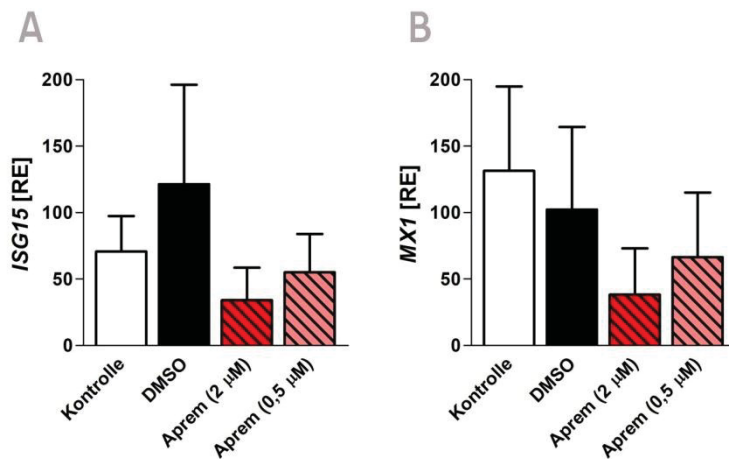


Abb. 18: Genexpressionsanalyse antiviraler Peptide in Synoviozyten nach Behandlung mit T-Zell-Überständen. Synoviozyten (n=8) wurden mit T-Zellüberständen verschiedener Bedingungen (Medium, DMSO und Apremilast (Aprem; 2 µM und 0,5 µM)) behandelt und für 24 h inkubiert. Gemessen wurde die Genexpression für *ISG15* (A) und *MX1* (B), angegeben in RE als Mittelwert + SEM.

3.6 Apremilast aktiviert Lymphozyten

Nach den Untersuchungen der Effekte des Apremilast auf die Expression von AMP und AVP in Keratinozyten und Synoviozyten wurde nun anhand eines Lymphozyten-Aktivierungstests untersucht, ob die Lymphozyten-Aktivierung durch Apremilast verändert wird. Aus Spenderblut wurden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, PBMC gewonnen und diese dann mit Apremilast behandelt. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde darauffolgend untersucht, wie viele CD3⁺-Zellen (T-Zellen) unter verschiedenen Bedingungen das Molekül CD69 auf ihrer Oberfläche tragen. Getestet wurden anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper als T-Zell-Aktivatoren, LPS als bakterielles und VZV gE als virales Antigen. In Abb. 19A sind zunächst die Einzelkomponenten/Kontrollen dargestellt. Anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper zeigt wie erwartet eine deutliche Aktivierung der T-Zellen, die durch Koinkubation mit verschiedenen Dosierungen des Apremilast signifikant reduziert ist (Abb. 19B). Interessanterweise ergibt sich zusammen mit LPS (Abb. 19C) ein anderes Bild. Während LPS zu ungefähr 10 % CD69⁺-CD3⁺-Zellen führt, scheint die Kombination aus LPS mit Apremilast einen synergistischen Effekt auf die T-Zell-Aktivierung zu haben und führt zu über 20 % CD69-positiver Zellen. Die Gründe für die scheinbare Aktivierung LPS-stimulierter T-Zellen durch Apremilast bleiben unklar.

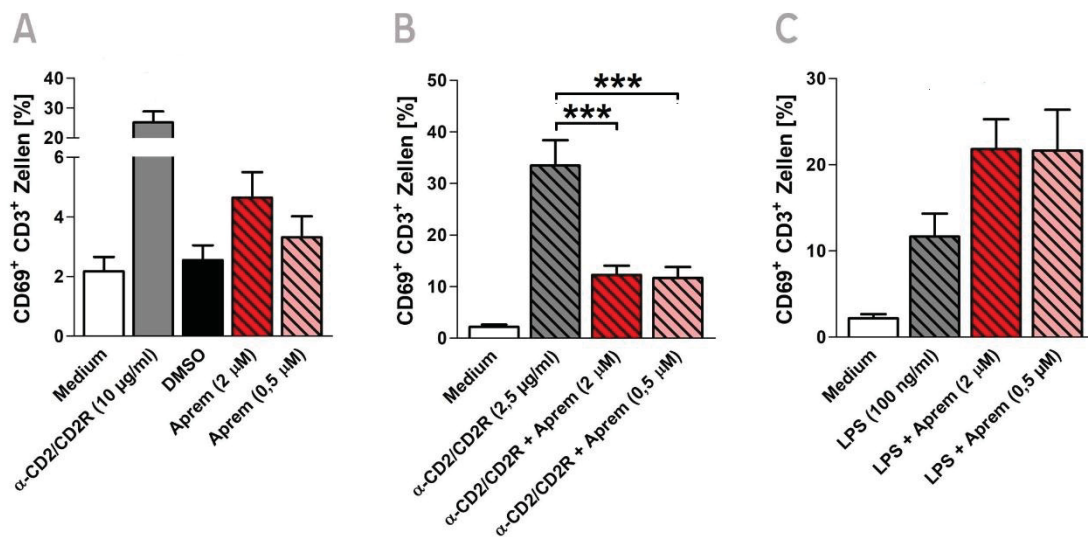


Abb. 19: Apremilast erhöht CD69-Expression in CD3⁺-Zellen. PBMC (n=6) wurden mit Apremilast (Aprem) und DMSO behandelt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Stimulanzen (anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper, LPS) und Kontrollreagenzien (PBS, anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper) wurden hinzugefügt und die Zellen für weitere 20 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie für CD69 und CD3 (in %) analysiert. A zeigt die Kontrollen, B zeigt α -CD2/CD2R und C zeigt LPS jeweils als Mittelwert + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Tests (***, $P \leq 0,001$).

Schließlich wurde die Aktivierung der T-Zellen durch das Varizella-Zoster Glykoprotein (VZV gE) untersucht (Abb. 20). Zur besseren Visualisierung wurde hier anstatt der Prozentzahlen auf den Änderungsfaktor zurückgegriffen. Die Kontrollbedingungen sind in Abb. 20A und VZV gE alleine und mit Apremilast in Abb. 20B dargestellt. Das virale VZV gE führt zu einer signifikanten Erhöhung der CD69-Expression, die durch Apremilast nicht negativ beeinflusst wird.

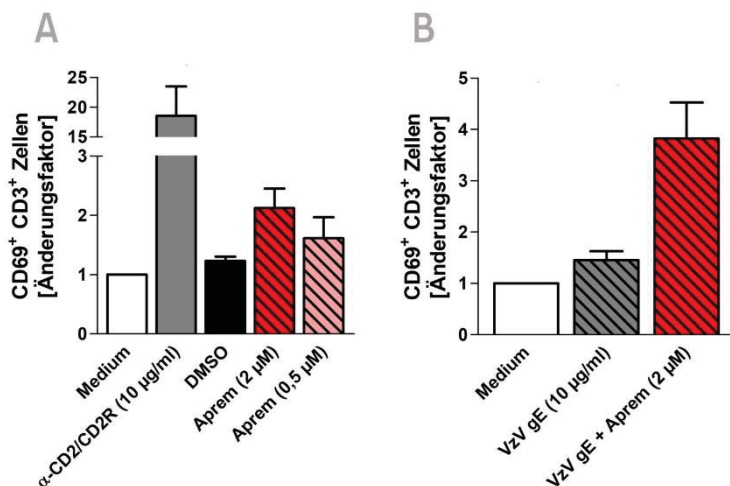


Abb. 20: Apremilast führt zusammen mit VZV gE zu einer synergistisch erhöhten Aktivierung in CD3⁺-Zellen. PBMC (n=6) wurden mit Apremilast (Aprem) und DMSO behandelt und für 45 min inkubiert. Stimulanzen (VZV gE) und Kontrollreagenzien (PBS, anti-CD2/anti-CD2R-Antikörper) wurden hinzugefügt und die Zellen für weitere 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Durchflusszytometrie für CD69 und CD3 (in %) untersucht. Die Ergebnisse sind dargestellt als Änderungsfaktor. A zeigt die Kontrollen, B zeigt VZV gE jeweils als Mittelwert + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Tests.

3.7 Apremilast hat keinen Einfluss auf die IFN-γ Sekretion in Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose

Hierbei wurde das Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose auf die Wirkung von Apremilast bezüglich des IFN-γ-Gehalts mit Hilfe eines IGRA untersucht. Zu diesem Zweck wurden Blutproben von Patienten mit latenter Tuberkulose mit Apremilast vorbehandelt und in spezielle QuantiFERON[®]-Röhrchen überführt. Die Ergebnisse (Abb. 21) zeigen, dass Apremilast keinen Einfluss auf die IFN-γ-Sekretion hat.

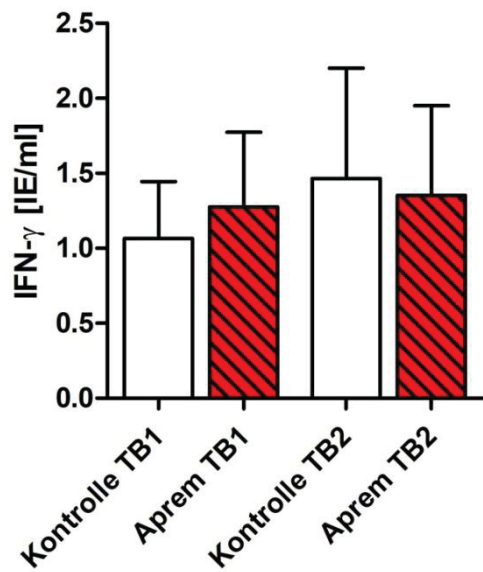


Abb. 21: Apremilast hat keinen Einfluss auf IFN- γ -Sekretion in Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose. Blut von Tuberkulose-Patienten (n=3) wurde mit Apremilast (Aprem) behandelt, in spezielle QuantiFERON®-Röhrchen pipettiert und für 16-20 h inkubiert. Anschließend wurde das Plasma gesammelt und mittels des IGRA auf den IFN- γ -Spiegel untersucht. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert + SEM, für die statistische Auswertung diente der Mann-Whitney-U-Test.

4 Diskussion

Die chronisch entzündliche, autoimmune Hauterkrankung Psoriasis geht meist einher mit roten, weiß-silbrig schuppenden Plaques, die sich über das gesamte Integument verteilen können. [15, 35] Darüber hinaus ist sie verbunden mit diversen weiteren Erkrankungen und einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität. [39] Ein Viertel bis ein Drittel der Patienten entwickelt zusätzlich eine Psoriasis-Arthritis, also eine Beteiligung der Gelenke. [31] Beeinflusst werden solch chronisch entzündliche Erkrankungen durch eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise IL-17, IL-22 oder IFN- γ . [30] In der Therapie wird Apremilast, ein oral einzunehmender PDE4-Inhibitor, eingesetzt. [39] PDE4 kommen besonders häufig in Immunzellen vor und spalten spezifisch cAMP in AMP, wodurch sie den intrazellulären cAMP-Spiegel senken. [40] Folglich erhöhen PDE4-Inhibitoren den cAMP-Spiegel in der Zelle, da kein cAMP mehr gespalten werden kann. Durch den erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel resultiert eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine vermehrte Produktion antiinflammatorischer Zytokine. [40] Dies führt zu einer deutlichen Besserung der Symptome der Psoriasis und Psoriasis-Arthritis. [40] Bei der Behandlung der Psoriasis und Psoriasis-Arthritis mit Apremilast wurden jedoch neben gastrointestinalen Beschwerden vermehrt Nasopharyngitis und Infektionen der oberen Atemwege als Nebenwirkungen beobachtet. [35] Auch bei einem der ersten spezifischen PDE4-Inhibitoren, dem Rolipram, kam es zu ähnlichen Nebenwirkungen. Diese beziehen sich vor allem auf das zentrale Nervensystem und den Gastrointestinaltrakt, jedoch wurde auch Mundtrockenheit beobachtet. Der genaue Wirkmechanismus dieser Nebenwirkungen ist jedoch nicht geklärt. [41, 42]

In dieser Studie wurde mithilfe verschiedener Untersuchungsverfahren die Wirkung des Apremilast auf Keratinozyten, Synoviozyten und T-Zellen, also Zellen, die in der Pathogenese der Psoriasis involviert sind, bezüglich dessen antimikrobieller und antiviraler Abwehr untersucht, um über die Ursache der infektiösen Nebenwirkungen einen besseren Kenntnisstand zu erlangen.

Zunächst wurde der Einfluss des Apremilast auf die Lebensfähigkeit der verwendeten Zellen untersucht. Durch die Zellvitalitätstests MTT-Assay und CellTiter Glo[®] konnte gezeigt werden, dass weder der Wirkstoff Apremilast, noch

das Lösungsmittel DMSO, in dem Apremilast gelöst ist, in den verwendeten Konzentrationen die Vitalität von Keratinozyten, Synoviozyten und T-Zellen beeinflusst. Ähnliche Tests, die den Einfluss von Apremilast auf die Zellvitalität ermitteln, scheint es bisher nicht zu geben. Dies korreliert mit anderen Untersuchungen, in denen keine Organ-spezifische Toxizität festzustellen war, weshalb Apremilast als sicherer Wirkstoff anerkannt ist und keine Notwendigkeit weiterer analytischer Kontrollen besteht. [39] So kann also in allen in dieser Untersuchungsreihe durchgeführten Tests davon ausgegangen werden, dass der Wirkstoff Apremilast keinen toxischen Effekt auf die verwendeten Zellen hat.

4.1 Effekte des Apremilast auf AMP und AVP in Keratinozyten

Zunächst wurden die Effekte des Apremilast auf Genebene erforscht. Hierzu wurden die Keratinozyten sowohl mit Substanzen behandelt, die die Genexpression stimulieren, als auch mit Apremilast. Mittels qPCR wurde anschließend die Genexpression diverser antimikrobieller und antiviraler Gene gemessen.

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben fällt zunächst auf, dass, mit Ausnahme des IL-17 und Esat-6 + CFP-10, die meisten getesteten bakteriellen Komponenten (z. B. LPS, LTA) in den Keratinozyten eher keine Reaktion zeigten. Auch bei den AVP gibt es Stimulanzen (z. B. IFN- γ), die eine erhöhte Genexpression bewirken, jedoch auch welche (z. B. VZV IE63), wo dieser Effekt eher zu vernachlässigen ist.

Kim *et al.* zeigt in einer Studie, in der ebenfalls Keratinozyten mit LPS stimuliert worden sind, dass die Keratinozyten auf die Stimulation mit bakteriellen Komponenten mit gesteigerter Genexpression reagieren. Anders als in dieser Arbeit wurden dort HaCaT-Keratinozyten verwendet und nach 8-stündiger Stimulationsdauer mit LPS eine erhöhte Proteinexpression von IFN- γ , TNF- α , IL-6 und IL-8 gemessen. [43] Natürlich stellt sich in dem Fall die Frage, weshalb die Zellen in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen so divers auf die Behandlung mit bakteriellen und viralen Komponenten reagiert haben. Da sowohl die Stimulationsdauer in der Untersuchung von Kim *et al.* geringer gewesen ist als in dieser Arbeit und auch nicht nur eine erhöhte Genexpression, sondern sogar eine erhöhte Proteinsekretion bei gleicher LPS-Konzentration gemessen worden ist, scheinen die immortalisierten HaCaT-Keratinozyten sensitiver auf die Stimulation zu

reagieren, als die Vorhaut- und Mamma-Präparate in dieser Studie. Diese Beobachtungen werden von den Untersuchungen im Rahmen der Dissertation von Susanne Betz bestätigt. [44] Kultivierte Keratinozyten, die wie in unserem Fall aus Vorhaut- oder Mamma-Gewebeproben stammen, können beispielsweise durch andere Zellen (z. B. Fibroblasten) kontaminiert sein. [45] Auch eine Variabilität zwischen den Geweben der Spender oder der Passagen ist möglich und die Lebenszeit der kultivierten Keratinozyten ist bekanntermaßen sowieso relativ gering. [46] HaCaT-Zellen, als langlebige, immortalisierte Zellen, weisen im Gegensatz dazu diese Probleme nicht auf und offenbaren sich daher als eine bevorzugte Zelllinie für *in vitro*-Untersuchungen. [46] Dementsprechend wäre es im Nachhinein sinnvoll gewesen, anstelle von normalen menschlichen Keratinozyten auf HaCaT-Keratinozyten auszuweichen, um eventuell beeinflussende Faktoren zu minimieren und so vielleicht klarere Ergebnisse zu erhalten.

Schaut man sich die Auswertung dieser Studie an, kann man zu dem Ergebnis kommen, dass der Wirkstoff Apremilast alleine einen leicht stimulierenden Einfluss auf die Genexpression antimikrobieller und antiviraler Gene in Keratinozyten haben könnte. Einen signifikanten Anstieg der Genexpression durch Apremilast gibt es aber nicht. Im Zusammenspiel mit den verwendeten Stimulanzen zeigen die Ergebnisse bei den AMP auch eher ein differentes Bild ähnlich der Situation ohne Apremilast. Zum Teil scheint Apremilast die Genexpression der AMP in Kombination mit Stimulanzen bakterieller Komponenten zu steigern (Abb. 9C), zum Teil kommt es zu einer Herunterregulation (Abb. 9B) oder es gibt kaum einen Unterschied (Abb. 9F). In keinem der Fälle kommt es aber zu einer signifikanten Änderung der Genexpression. Einen ähnlichen Eindruck bekommt man, wenn man sich die Auswertung der Ergebnisse bei den AVP anschaut. Hier ist sogar eine geringere Divergenz als bei den AMP zu beobachten und die Ergebnisse zeigen deutlicher, dass ein Einfluss von Apremilast auf die Genexpression eher als marginal zu bezeichnen ist. Man kann also annehmen, dass die oben genannten Abweichungen durch Apremilast keine klinische Relevanz beziehungsweise Konsequenz haben und gegebenenfalls auch auf Laborartefakte zurückzuführen sind. Da auch in der Literatur keine gegensätzlichen Beobachtungen beschrieben sind, ist davon auszugehen, dass AMP und AVP in Keratinozyten durch Apremilast nicht beeinflusst werden.

4.2 Effekte des Apremilast auf AMP und AVP in Synoviozyten

Synoviozyten sind Zellen der Synovialmembran und teilen sich in A- und B-Synoviozyten auf. A-Synoviozyten sind Makrophagen ähnlich und gehören zum Mononukleär-phagozytären System (MPS), was sie zu einem Teil des Immunsystems macht. Zusätzlich können sie Bestandteile der Synovia aufnehmen und in die Lymphbahn weiterleiten und auch einige sekretorische Leistungen erbringen. Hauptsächlich sind allerdings die Fibroblasten-ähnlichen B-Synoviozyten die Zellen, die Synovialbestandteile synthetisieren und anschließend sezernieren. [47] Diese *Human Fibroblast-like Synoviocytes* (HFLS) sind auch in den Experimenten dieser Untersuchungsreihe verwendet worden.

Für die Synoviozyten wurden die gleichen Untersuchungsverfahren verwendet wie für die Keratinozyten. Auch hier wurde zunächst die Genexpression antimikrobieller und antiviraler Peptide erforscht. Betrachten wir zunächst wieder die stimulierenden Substanzen alleine. Hier ist festzustellen, dass es bei den AMP kaum eine Wirkung der Stimulanzien auf die Genexpression gibt. Auch bei den AVP zeigt sich bei den Synoviozyten kein signifikanter Effekt. Durch zusätzliche Zugabe von Apremilast kommt es, wie schon bei den Keratinozyten zu sehen, zu einem nicht eindeutigen Bild. Auch hier sind bei den AMP teilweise Hochregulation (Abb. 10D), teilweise Herunterregulation (Abb. 10C) und teilweise kein Effekt (Abb. 10B) erkennbar. Bei den AVP scheint zumindest im Falle der höheren Apremilast-Konzentration (2 μM) eine hochregulierende Wirkung vorzuliegen, im Falle der niedrigeren Konzentration aber auch schon wieder kein Einfluss. Im Unterschied zu den Keratinozyten ist die Wirkung des Apremilast alleine bei den Synoviozyten eher inhibierend auf die Genexpression. Wobei diese Tendenz nur bei der höheren Konzentration von 2 μM auffällig ist.

Ein Erklärungsansatz, weshalb die Synoviozyten in dieser Arbeit keine einheitlichen Ergebnisse liefern, könnte unter Umständen wie folgt erklärt werden: Wie oben beschrieben, ist die Hauptaufgabe dieser Zellen im Allgemeinen die Sekretion der Synovialflüssigkeit. Unter Umständen ist dieser Zelltyp gar nicht in der Lage eine angemessene Immunantwort zu geben und zeigt daher unter Apremilast kein konsistentes Bild. Henrike E. T. Bierkarre beschäftigte sich in ihrer Dissertation mit der Frage, inwieweit AMP, die in psoriatischer Haut stark induziert sind, auch in der Synovialis der PsA exprimiert werden. Ihre Ergebnisse zeigten, dass in der PsA

durchaus eine Immunreaktivität gegenüber einigen AMP nachweisbar war (S100A8, S100A9, HNP1-3), diese aber weitestgehend auf im Rahmen der Entzündung eingewanderte Leukozyten zurückzuführen war und nur zu einem geringen Teil durch Synoviozyten zustande kam. In gesunder Synovialis war die Immunantwort laut ihrer Ergebnisse zudem deutlich geringer. Dies bestärkt die Vermutung, dass die Immunantwort in der PsA hauptsächlich nicht durch Synoviozyten zustande kommt. Weiter wurde überlegt, dass bei der sterilen Entzündung in der PsA Mikroben fehlen und daher die antimikrobielle Wirkung, im Gegensatz zur Wirkung bei entzündeter Haut und damit in Keratinozyten, nicht dominiert. [48] Auch Paulsen *et al.* hat die Expression und Produktion antimikrobieller Peptide in der Synovialis untersucht. Er beschreibt ebenfalls, dass die antimikrobielle Abwehr in der Synovialmembran hauptsächlich von dort ansässigen Neutrophilen ausgeht und auch abhängig von der lokalen bakteriellen Mikroflora ist. Zusätzlich scheint es in seinen Untersuchungen auch einen Unterschied zwischen A- und B-Synoviozyten bezüglich der Expression von AMP zu geben. Scheinbar hat er festgestellt, dass in den B-Synoviozyten deutlich weniger AMP nachweisbar waren als in den A-Synoviozyten. [17] Weiterführende Untersuchungen, die den Unterschied von A- und B-Synoviozyten unter Apremilast-Behandlung erörtern, gibt es bislang aber offenbar nicht. Generell gibt die Literatur auf diesem Gebiet eher spärlich Aufschluss, weshalb, basierend auf den oben genannten Überlegungen und ersten Ergebnissen, weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssten, um detailliertere Erkenntnisse zu erlangen.

4.3 Auswirkungen von Apremilast auf T-Zell-Differenzierung

Die T-Zellen wurden in dieser Untersuchung ausschließlich mit Apremilast in den Konzentrationen 2 μM und 0,5 μM stimuliert und im Anschluss durch Zugabe diverser Substanzen zu T_H17 -Zellen differenziert. Unter diesen Bedingungen wurde dann die Genexpression verschiedener T_H17 -Zell-assoziiierter Gene gemessen, um den Einfluss des Apremilast auf die T-Zell-Entwicklung zu untersuchen. Im weiteren Verlauf könnte dies dann auch Einfluss auf die Produktion antimikrobieller und antiviraler Peptide in Keratinozyten und Synoviozyten haben. Gezeigt hat sich, dass die Genexpression in den T-Zellen durch Apremilast teilweise leicht erhöht (Abb. 13D, 13G, 13F), teils aber auch keine Reaktion zu erkennen war (Abb. 13C). Bei

der Untersuchung der Proteinsekretion von IL-17 und IL-26 durch die T-Zellen (Abb. 14) konnte durch die Durchflusszytometrie ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Tendenziell scheint die IL-17-Sekretion durch Apremilast gesteigert, die IL-26-Sekretion hingegen eher gehemmt.

Im Vergleich zur Literatur scheinen die Ergebnisse mit erhöhter Genexpression beziehungsweise mit der gesteigerten Proteinsekretion des IL-17 nicht wirklich plausibel. Realistischer stellen sich die Werte dar, wo kein Effekt oder sogar ein hemmender Einfluss des Apremilast auszumachen war. Wie bereits in Kapitel 1.7.1 beschrieben, wirkt der PDE4-Inhibitor Apremilast über erhöhte cAMP-Spiegel, der damit verbundenen Aktivierung der PKA und daraufhin gehemmtes NF- κ B, sodass es im Anschluss zu einer Senkung proinflammatorischer und zu einer Steigerung antiinflammatorischer Zytokine kommt. Laut Hueber und Manger kommt es durch erhöhtes cAMP aber auch zur Veränderung T-Zell-aktivierender Signale und dann zum Eingriff in die Differenzierung naiver CD4⁺-T-Zellen zu T_H17-Zellen. [49] Weiterhin soll der sogenannte Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Signalweg bei der T_H17-Zell-Differenzierung beteiligt sein, mit dem PDE4 ebenfalls interagiert. [50] Diese verschiedenen Mechanismen müssten bewirken, dass die Entstehung von T_H17-Zellen erschwert ist sowie die Anzahl dieser reduziert ist und es im Anschluss zu verminderter Genexpression und Proteinsekretion käme. Gleiches bestätigen die Untersuchungen von Schafer und Kollegen, in denen gezeigt werden konnte, dass nach einer 40-wöchigen Einnahme von 20 oder 30 mg Apremilast die Plasmakonzentration von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17 deutlich reduziert war, die von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 jedoch angestiegen ist. Auch Schafer *et al.* führten die Beobachtungen auf die langandauernde Inhibition der systemischen T_H17 Immunantwort und der PDE4 zurück. [51]

Festzuhalten ist dagegen, dass es sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen um *in vitro*-Erhebungen handelt. Komplexe Systeme und Reaktionsketten, wie sie *in vivo* vorkommen, sind hier nur teilweise nachzustellen. Gegebenenfalls entstehen daher andere Ergebnisse als erwartet und die beobachteten hochregulierenden Einflüsse sind für die klinische Relevanz eher in Frage zu stellen.

4.4 AMP- und AVP-Expression in Keratinozyten und Synoviozyten nach Behandlung mit T-Zell-Überständen

Schauen wir uns als erstes die Keratinozyten an, die mit dem Überstand der Apremilast-behandelten T-Zellen stimuliert wurden. Das Gen für *S100A7* ist das einzige Gen, das eine erhöhte Expression zeigt (Abb. 15A). *LL37*, sowie die Genexpressionen der beiden antiviralen Peptide *ISG15* und *MX1* zeigen keine Reaktion auf den Überstand der Apremilast-behandelten T-Zellen (Abb. 15B, 16 A+B).

Die Ergebnisse des Kapitels 3.4 ergaben, dass unsere T-Zellen nicht oder leicht stimulierend durch Apremilast beeinflusst wurden. Die Genexpression in den T-Zellen führt zu einer dementsprechenden Zytokinproduktion, die wiederum dann die Genexpression in den Zielzellen (Keratinozyten) steuern. Da in den Untersuchungen dieses Kapitels die Überstände genau dieser T-Zellen verwendet wurden, liegt es nahe, dass sich die Ergebnisse des ersten Versuchs auf die des anschließenden Versuchs auswirken. So ist es also nicht verwunderlich, dass die Genexpressionsanalysen der Keratinozyten hauptsächlich keine Reaktion auf den Überstand der mit Apremilast behandelten T-Zellen zeigten und in einem Fall eine Hochregulation.

In den Synoviozyten sind die Ergebnisse, wie aus vorherigen Experimenten bekannt, auch in diesem Versuch divers. Wo die Genexpressionsanalysen der AMP sich ins Gesamtbild des Versuchs eingliedern und auch ohne oder mit leicht stimulierendem Apremilast-Einfluss reagieren, zeigen die AVP in den Synoviozyten eher ein reduziertes Verhalten. Wahrscheinlich ist für das nicht einheitliche Ergebnis hier die gleiche Erklärung heranzuziehen wie in Kapitel 4.2, nämlich dass von diesen Zellen eher eine geringe Immunantwort ausgeht.

Zuletzt sei natürlich auch hier wieder zu sagen, dass die Ergebnisse nicht unbedingt die klinische Realität ausdrücken, weil es sich lediglich um *in vitro*-Experimente handelt.

4.5 Einfluss des Apremilast auf die Lymphozyten-Aktivierung

Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, wurde auch analysiert, wie sich Apremilast auf die Aktivierung von T-Zellen auswirkt. Wie zu erwarten war, hat der T-Zell-Aktivator anti-CD2/CD28-Antikörper zu einer signifikanten Steigerung der CD69⁺-CD3⁺-Zellzahl geführt. Im Vergleich dazu wird die Aktivierung jedoch erwartungsgemäß signifikant gehemmt, wenn zu dem T-Zell-Aktivator zusätzlich Apremilast verabreicht wird. Es macht in dieser Untersuchung allerdings den Eindruck, als sei diese Hemmung spezifisch für den Signalweg über die initiierte zelluläre Co-Stimulation (über CD2-Oberflächenmoleküle), denn anders sieht es bei nicht-körperigen Aktivatoren wie dem LPS und dem VZV gE aus. Hier scheint Apremilast fördernd auf den sowieso vorhandenen aktivierenden Einfluss der bakteriellen beziehungsweise viralen Bestandteile auf die T-Zell-Differenzierung zu wirken. Die Gründe hierfür bleiben unklar und sind am ehesten als experimentelles Artefakt ohne klinische Relevanz einzuordnen.

4.6 Effekt des Apremilast auf die IFN- γ -Sekretion in Blut

Die Untersuchung des Blutes von Patienten mit latenter Tuberkulose, das mit Apremilast behandelt und TB-Antigenen behandelt und anschließend auf die Sekretion des IFN- γ untersucht wurde, zeigte keine reduzierte Sekretion des Zytokins (Abb. 21). Diese experimentellen Daten stehen im Einklang mit den klinischen Auswertungen von Del Rosso *et al.*, in denen Daten über Apremilast aus mehreren Jahren betrachtet wurden und keine erhöhte Reaktivierung latenter Infektionen wie der Tuberkulose ergaben. [52]

4.7 Weitere Überlegungen

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Apremilast wurden Keratinozyten, Synoviozyten und T-Zellen getestet. Diese Zelltypen sind bei dem Krankheitsbild der Psoriasis betroffen bzw. beteiligt, weshalb sie für die hier durchgeführten Analysen ausgewählt worden sind. Die bei der Psoriasis-Therapie mit Apremilast beschriebenen Nebenwirkungen Nasopharyngitis und Infektionen der oberen Atemwege betreffen jedoch nicht direkt die Gewebe mit diesen Arten

von Zellen, sondern die Schleimhäute des Respirationstraktes mit seinen speziellen Zellen. Hierzu gehören hauptsächlich die Zylinderepithelzellen, die mit 5-10 μm langen Kinozilien besetzt sind und für den Transport feinsten Partikel im Schleimfilm sorgen, und die Becherzellen, die zwischen den Zylinderzellen liegen und den Schleim sowie spezifische Proteine produzieren (Abb. 22). [53]

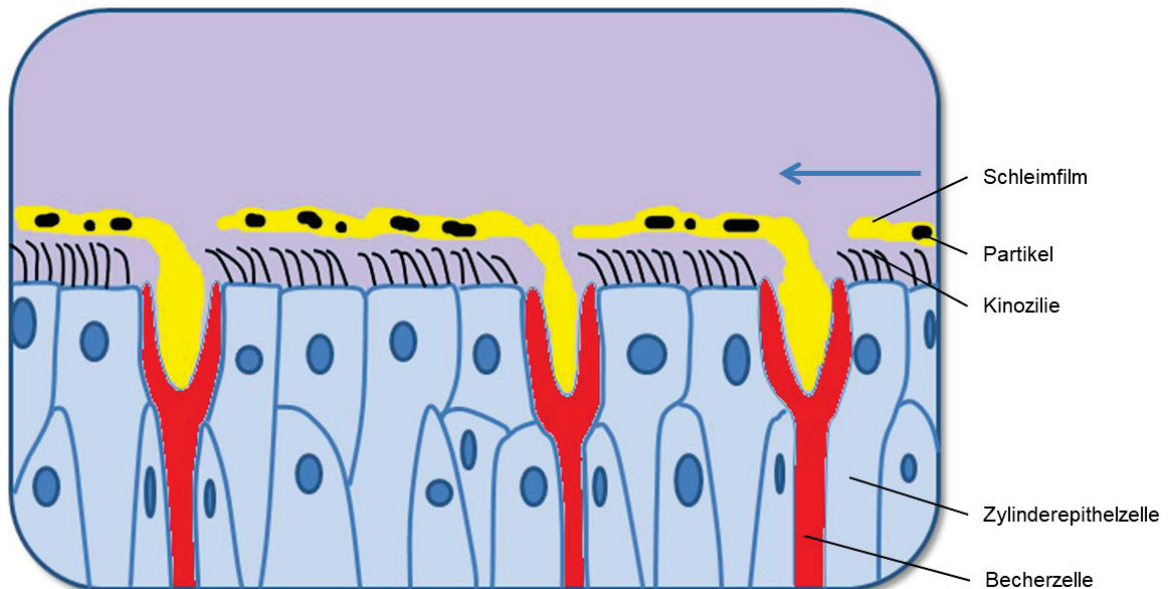


Abb. 22: Aufbau der Bronchialschleimhaut. Die 5-10 μm langen Kinozilien des Zylinderepithels der Bronchialschleimhaut transportieren den von den Becherzellen gebildeten Schleimfilm rachenwärts. Dieser bindet feinste Partikel und wird durch Schlucken oder Husten eliminiert. (Eigene Zeichnung)

Zu den Bestandteilen des Schleimfilms gehören auch antibakteriell wirkende Proteine, Immunglobuline und Proteinaseinhibitoren, was dem Schleimfilm eine Rolle in der antimikrobiellen Abwehr zuschreibt. [53] Zu den Hauptmuzinen des Sekrets der Becherzellen gehört das sogenannte sekretorische gelbildende MUC2, eines von 20 vorkommenden Muzinen, zu denen sekretorische gelbildende und Membran-gebundene Muzine gehören. [54] MUC2 besitzt Oligosaccharide, an die sich mikrobielle Bestandteile anheften können. [54] Die Zylinderepithelzellen transportieren den Schleimfilm mitsamt den angehefteten Partikeln mit ihren Zilien Richtung Rachen. Dort werden sie gesammelt und durch Schlucken oder Husten eliminiert. [53] MUC2 hat im Promotor eine Bindungsstelle für NF- κ B und daher führen beispielsweise das proinflammatorische Zytokin TNF- α , die T_H1 - und T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-13, aber auch mikrobielle Produkte zu vermehrter Transkription von MUC2 über die Aktivierung von NF- κ B. [54] Wie in Kapitel 1.7.1 bereits erläutert,

führt ein erhöhter cAMP-Spiegel über die Aktivierung der PKA und CREB zur Inhibierung von NF- κ B. [28] Folglich kommt es zu einer verminderten Transkription von MUC2 und letztendlich zu einer verringerten Schleimproduktion. Zu diesem Szenario könnte es wohl unter Apremilast-Einnahme kommen, da Apremilast als PDE4-Inhibitor den cAMP-Spiegel erhöht. [28] Dies würde erklären, weshalb bei der Psoriasis-Therapie mit Apremilast vermehrt Infektionen im Respirationstrakt beobachtet worden sind. Durch verminderte MUC2-Produktion können unter anderem weniger mikrobielle Substanzen gebunden und mit dem Schleimfilm entfernt werden. Durch die Minderung oder sogar den Wegfall dieser ersten antimikrobiellen Barriere haben die Bakterien und bakteriellen Bestandteile leicht die Möglichkeit die Schleimhaut des Respirationstraktes zu befallen und eine Infektion auszulösen. Gezeigt werden konnte dies an Mäusen, denen das MUC2 fehlte. Diese Mäuse wiesen eine erhöhte Permeabilität und bakterielle Adhäsion an der epithelialen Oberfläche auf. [54] Durch diese Hypothese könnten im Übrigen auch die durch PDE4-Inhibitoren ausgelösten gastrointestinalen Beschwerden erklärt werden, da sich im Gastrointestinaltrakt ebenfalls Becherzellen befinden, die genau wie im Respirationstrakt MUC2 bilden. [54] Weiterhin wird die hemmende Wirkung auf die MUC2-Produktion im Rahmen der Behandlung von Asthma und COPD zusätzlich zu den bronchospasmolytischen und antiinflammatorischen Effekten der PDE4-Inhibition [41] genutzt, da der bei diesen Erkrankungen vermehrt auftretende Schleim verringert werden kann. [55]

Für die Bestätigung dieser theoretisch aufgestellten Überlegungen müsste der Effekt von Apremilast auf die Becherzellen untersucht werden. Dafür würde es Sinn machen eine Zellkultur anzulegen, um die Becherzellen unter diversen Bedingungen mit Apremilast behandeln zu können. Basierend auf ausführlichen Recherchen scheint es jedoch schwierig zu sein, Becherzellen isoliert zu kultivieren, was aus dem Mangel an diesbezüglichen wissenschaftlichen Facharbeiten interpretiert wird. Lediglich Studien zu Becherzellen aus dem Intestinaltrakt lassen sich finden, daher müsste gegebenenfalls auf diese Zellen zurückgegriffen werden. Eine Möglichkeit zeigten Thomas E. Phillips und seine Kollegen, indem sie Subklone einer *HT29 human colon carcinoma* Zelllinie verwendeten, um Zellen mit typischer Becherzell-Morphologie zu erhalten. [56] Eine andere Möglichkeit zur Differenzierung von Becherzellen aus kultivierten primären, epithelialen

Intestinalzellen wurde detailliert von Agnieszka Pastula und Michael Quante beschrieben. [57]

Andere Überlegungen betreffen die PDE4. Anhand des archetypischen PDE4-Hemmers Rolipram konnte gezeigt werden, dass es am PDE4 zwei Bindungsstellen für den Inhibitor gibt. Die *high-affinity rolipram binding site* (HARBS) und die *low-affinity rolipram binding site* (LARBS). [41, 58] Die Bindung der PDE4-Inhibitoren an die HARBS wurde zunächst für die Nebenwirkungen Übelkeit und Erbrechen verantwortlich gemacht, da HARBS hauptsächlich im ZNS lokalisiert sind. [41, 58] Weiterführende Untersuchungen mit anderen PDE4-Inhibitoren zeigten dann jedoch, dass die HARBS offenbar doch keine große Relevanz diesbezüglich zu haben scheinen. [58] Trotzdem sollte die Tatsache, dass es diese zwei Bindungsstellen am PDE4 gibt, nicht außer Acht gelassen werden. Da anscheinend bisher noch nicht viel über die beiden Bindungsstellen des PDE4 bekannt ist, könnte durchaus ein Zusammenhang zwischen Apremilast, den PDE4-Bindungsstellen und den Infektionen der oberen Atemwege als Nebenwirkung existieren, der aber bisher noch unbekannt ist. Ein anderer Ansatz bezieht sich auf die unterschiedlichen PDE4-Subtypen. So wird vermutet, dass der PDE4B hauptsächlich für die antiinflammatorischen Effekte verantwortlich ist und der PDE4D für Übelkeit und Erbrechen. [58] Es erwies sich bisher jedoch als schwierig, selektive Inhibitoren für z. B. PDE4A und PDE4B herzustellen, die nicht auch auf PDE4D wirken. [42] Zusätzlich zeigten auch Versuche mit Cilomilast, Roflumilast und MK-0359, die jeweils alle drei PDE4-Subtypen inhibieren, unterschiedlich starke gastrointestinale Nebenwirkungen. Dies würde wiederum bedeuten, dass die Nebenwirkungen nicht auf unterschiedliche Affinität der Inhibitoren zu den PDE4-Subtypen beruhen, sondern gegebenenfalls auf eine unterschiedliche Verteilung in den wesentlichen Geweben. [42] Aus diesen Ausführungen wird schnell klar, dass es verschiedene Ansatzmöglichkeiten gibt, wodurch die Nebenwirkungen von PDE4-Inhibitoren (speziell Apremilast) verursacht werden könnten. Es ist jedoch auch offensichtlich, dass in diesem Bereich noch sehr viel Unkenntnis herrscht und die bisherigen Erkenntnisse bei weitem nicht ausreichen, um eine Erklärung für die beschriebenen Nebenwirkungen zu liefern. Trotzdem können all diese Ansätze Basis für weitere Untersuchungen sein, die zur Aufklärung der Ursache der Infektionen oberer Atemwege beitragen.

4.8 Fazit/Schlussfolgerung

Wie bereits zu Anfang erwähnt, stellt der Wirkstoff Apremilast eine wirksame Möglichkeit zur Behandlung der Psoriasis und Psoriasis-Arthritis dar. Trotz grundsätzlich guter Verträglichkeit wurden gehäuft Nebenwirkungen unter anderem Infektionen der oberen Atemwege beschrieben. Die Untersuchungen dieser Arbeit beschäftigten sich mit möglichen Zusammenhängen zwischen dem Wirkstoff Apremilast und der antimikrobiellen und antiviralen Abwehr.

In der Zusammenfassung aller Ergebnisse wird deutlich, dass es keine relevanten Einflüsse von Apremilast auf die antimikrobielle und antivirale Abwehr gibt. Einen klaren Hinweis darauf, dass Apremilast die antimikrobielle oder antivirale Antwort negativ beeinflusst, war nicht nachweisbar. Teilweise zu beobachtende Hoch- oder Herunterregulationen beispielsweise in Bezug auf die Genexpressionsanalysen diverser antimikrobieller und antiviraler Gene werden klinisch eher keine Bedeutung haben.

Insgesamt entsprechen die hier erlangten Ergebnisse dem, was bereits andere Studien ergeben haben. Wichtig sei dennoch zu erwähnen, dass es sich bei den Experimenten dieser Arbeit um *in vitro*-Versuche handelt. Für weiterführende Erkenntnisse wären sicherlich klinische *in-vivo*-Studien gewinnbringend. Auch mögliche andere Ursachen für die Nebenwirkungen sollten diskutiert und überprüft werden. Da Apremilast noch ein sehr neuer Wirkstoff ist, gibt es noch viel Ungeklärtes und in Zukunft wird es immer mehr neue Erkenntnisse geben, sodass die Wirkungsweise des Apremilast immer mehr verstanden wird.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Sterry, W., *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Thieme.
2. Sabrina Furter, K.C.J., *Crashkurs Dermatologie*. Urban & Fischer.
3. Mühlstädt, M., *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Elsevier.
4. Platzer, W., *Taschenatlas Anatomie, 1 Bewegungsapparat*. 2013: Thieme.
5. Efskind, L., *Experimentelle Untersuchungen über Die Anatomie und Physiologie Der Gelenkkapsel: I. Die normale und pathologische Histologie der Synovialmembran*. Acta Orthopaedica Scandinavica, 1941. **12**(1-4): p. 214-266.
6. Michl, M., *Basics Hämatologie*. 2005: Elsevier.
7. Behrends, J.B., Josef, *Duale Reihe - Physiologie*. 2012: Thieme.
8. Christine Schütt, B.B., *Grundwissen Immunologie*. 2011: Spektrum.
9. Oethinger, M., *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie*. 2004: Urban & Fischer.
10. Kamradt T., F.-K.K., *Das adaptive Immunsystem*. 2011.
11. Peters, A., Y. Lee, and V.K. Kuchroo, *The many faces of Th17 cells*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(6): p. 702-6.
12. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-1569.
13. Matthias Krams, S.O.F., Udo Kellner, Christian Mawrin, *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2013: Thieme.
14. Bals, R., *Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika*. Medizinische Klinik, 2000. **95**(9): p. 496-502.
15. Palfreeman, A.C., K.E. McNamee, and F.E. McCann, *New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: a focus on apremilast*. Drug design, development and therapy, 2013. **7**: p. 201-210.
16. Schröder, J.-M., *Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan*. Der Hautarzt, 2002. **53**(6): p. 424-435.
17. Paulsen, F., et al., *Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes*. The Journal of Pathology, 2002. **198**(3): p. 369-377.
18. Ryckman, C., et al., *Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(6): p. 3233-3242.
19. Glaser, R., et al., *Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 57-64.
20. Wolk, K., et al., *IL-29 Is Produced by T_H17 Cells and Mediates the Cutaneous Antiviral Competence in Psoriasis*. Science Translational Medicine, 2013. **5**(204): p. 204ra129-204ra129.
21. Sadler, A.J. and B.R.G. Williams, *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**: p. 559.

22. Chen, L., et al., *ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment*. Journal of General Virology, 2010. **91**(2): p. 382-388.
23. Kunkeaw, N., et al., *Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma*. Oncogene, 2012. **32**: p. 3722.
24. Mullan, P.B., et al., *The 2,5 oligoadenylate synthetase/RNaseL pathway is a novel effector of BRCA1- and interferon-γ-mediated apoptosis*. Oncogene, 2005. **24**: p. 5492.
25. Verhelst, J., et al., *Interferon-inducible Mx1 protein inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly*. Journal of Virology, 2012.
26. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferon interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities*. Virology, 1991. **183**(1): p. 1-11.
27. Smith, J.A., et al., *Involvement of the Interferon-Regulated Antiviral Proteins PKR and RNase L in Reovirus-Induced Shutoff of Cellular Translation*. Journal of Virology, 2005. **79**(4): p. 2240-2250.
28. Schafer, P., *Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis*. Biochemical Pharmacology, 2012. **83**(12): p. 1583-1590.
29. Reich, K. and M. Augustin, *Arzneimittelsicherheit bei Psoriasis: Welche Rolle spielt Suizidalität?* JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2017. **15**(3): p. 353-355.
30. Wittmann, M. and P.S. Helliwell, *Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases*. Dermatol Ther (Heidelb), 2013. **3**(1): p. 1-15.
31. Amherd-Hoekstra, A., et al., *Psoriasisarthritis: ein Übersichtsartikel*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2010. **8**(5): p. 332-340.
32. Schoen, R.B., A.; Miehke, K., *Klinik der rheumatischen Erkrankungen*. 1970: Springer-Verlag.
33. Beipackzettel, *Beipackzettel Otezla 30 mg*. 2018.
34. Herold, M., *Psoriasis-Arthritis: Neue Entwicklungen in der Therapie am Beispiel der PDE4 Hemmung*. 2016.
35. Curdin Conrad, M.G., *Psoriasis: Was gibt es Neues, und was bringt die Zukunft?* 2016.
36. Scharthl, M.G., M.; von Eckardstein, A., *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. 2009: URBAN&FISCHER.
37. Horn, F., *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 2012: Thieme.
38. Rassow, J.H., Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer, *Duale Reihe - Biochemie*. 2008: Thieme.
39. Torres, T. and L. Puig, *Apremilast: A Novel Oral Treatment for Psoriasis and Psoriatic Arthritis*. American Journal of Clinical Dermatology, 2018. **19**(1): p. 23-32.
40. Kavanaugh, A., et al., *Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2014. **73**(6): p. 1020-1026.

41. Martin, C., et al., *Airway relaxant and anti-inflammatory properties of a PDE4 inhibitor with low affinity for the high-affinity rolipram binding site*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2002. **365**(4): p. 284-289.
42. Higgs, G., *Is PDE4 too difficult a drug target?* Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(5): p. 495-8.
43. Kim, W.-H., et al., *Anti-Inflammatory Effect of Melittin on Porphyromonas Gingivalis LPS-Stimulated Human Keratinocytes*. Molecules, 2018. **23**(2): p. 332.
44. Betz, S., *Vergleich der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion von HaCaT-Keratinozyten und kultivierten Keratinozyten aus gesunder und psoriatischer Haut*. 2001.
45. Linge, C., M.R. Green, and R.F. Brooks, *A method for removal of fibroblasts from human tissue culture systems*. Experimental Cell Research, 1989. **185**(2): p. 519-528.
46. Schürer, N., et al., *Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes*. Experimental Dermatology, 1993. **2**(4): p. 179-185.
47. Prof. Dr. med. Graumann, W.P.D.m.S., Dieter, *Allgemeine Anatomie*. 2004: Schattauer.
48. Bierkarre, H.E.T., *Expression antimikrobieller Peptide in der Synovialis der Psoriasis-Arthritis, bei rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis sowie in der Haut der Psoriasis*. 2015.
49. Hueber, A.J. and B. Manger, *Neues zur Pathogenese der Psoriasisarthritis*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2013. **72**(8): p. 758-763.
50. Quintana, F.J., et al., *Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
51. Schafer, P.H., et al., *The Pharmacodynamic Impact of Apremilast, an Oral Phosphodiesterase 4 Inhibitor, on Circulating Levels of Inflammatory Biomarkers in Patients with Psoriatic Arthritis: Substudy Results from a Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Trial (PALACE 1)*. Journal of Immunology Research, 2015. **2015**: p. 906349.
52. Del Rosso, J.Q. and L. Kircik, *Oral Apremilast for the Treatment of Plaque Psoriasis*. The Journal of clinical and aesthetic dermatology, 2016. **9**(9): p. 43-48.
53. Rohen, J.W.L.-D., Elke, *Funktionelle Histologie*. 2000: Schattauer.
54. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress*. Current Gastroenterology Reports, 2010. **12**(5): p. 319-330.
55. Mata, M., et al., *Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells*. Thorax, 2005. **60**(2): p. 144-152.
56. Phillips, T.E., et al., *Human intestinal goblet cells in monolayer culture: characterization of a mucus-secreting subclone derived from the HT29 colon adenocarcinoma cell line*. Gastroenterology, 1988. **94**(6): p. 1390-403.
57. Pastula, A.M. and M. Quante, *Isolation and 3-dimensional Culture of Primary Murine Intestinal Epithelial Cells*. Bio-protocol, 2014. **4**(10): p. e1125.
58. Lipworth, B.J., *Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. The Lancet, 2005. **365**(9454): p. 167-175.

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der Haut.....	1
Abb. 2: Aufbau des Gelenks.....	4
Abb. 3: T-Zell-Differenzierung aus naiven CD4 ⁺ -T-Zellen.....	10
Abb. 4: Wirkmechanismus von Apremilast.....	19
Abb. 5: Funktionsweise von CellTiter-Glo®.....	30
Abb. 6: cDNA-Synthese.....	33
Abb. 7: Zyklus der PCR.....	36
Abb. 8: MTT-Assay für Keratinozyten und CellTiter Glo® für Synoviozyten und T-Zellen zur Untersuchung der Zellvitalität.....	46
Abb. 9: <i>S100A7</i> -Genexpression in Keratinozyten nach Stimulation mit Apremilast und Zytokinen sowie antimikrobiellen Komponenten.....	48
Abb. 10: <i>S100A7</i> -Genexpression in Synoviozyten nach Stimulation mit Apremilast.....	51
Abb. 11: Expression des Gens <i>OASL</i> in Keratinozyten nach Stimulation mit Apremilast und Zytokinen sowie antiviralen Komponenten.....	53
Abb. 12: Synoviale <i>OAS2</i> -Expression nach Stimulation mit Apremilast in Gegenwart von IFN- γ oder IL-29.....	55
Abb. 13: Genexpression in T-Zellen nach Differenzierung zu T _H 17-Zellen.....	57
Abb. 14: Expression der Zytokine IL-17 und IL-26 in CD4 ⁺ -T-Zellen.....	58
Abb. 15: Expression der Gene <i>S100A7</i> und <i>LL37</i> nach Behandlung mit Apremilast- enthaltenden T-Zell-Überständen in Keratinozyten.....	59
Abb. 16: Genexpression antiviraler Peptide nach Behandlung mit T-Zell-Überständen in Keratinozyten.....	59
Abb. 17: Analyse der antimikrobiellen Peptide <i>S100A7</i> und <i>LL37</i> nach Behandlung mit T-Zell- Überständen in Synoviozyten.....	60
Abb. 18: Genexpressionsanalyse antiviraler Peptide in Synoviozyten nach Behandlung mit T-Zell-Überständen.....	61
Abb. 19: Apremilast erhöht CD69-Expression in CD3 ⁺ -Zellen.....	62
Abb. 20: Apremilast führt zusammen mit VZV gE zu einer synergistisch erhöhten Aktivierung in CD3 ⁺ -Zellen.....	63
Abb. 21: Apremilast hat keinen Einfluss auf IFN- γ -Sekretion in Blut von Patienten mit latenter Tuberkulose.....	64
Abb. 22: Aufbau der Bronchialschleimhaut.....	73

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Stimulationsbedingungen	24
Tabelle 2: Mengenangaben der Reagenzien pro Probe für die drei benötigten Mixe	35
Tabelle 3: Liste der TaqMan®-Assay-on-Demand-qPCR-Primersequenzen	38
Tabelle 4: Liste der TaqMan®-qPCR-Primersequenzen für hBD2	38
Tabelle 5: Liste der SYBR®-qPCR-Primersequenzen	39
Tabelle 6: Stimulationsbedingungen für die Lymphozyten-Aktivierung.	41
Tabelle 7: Liste aller getesteten antimikrobiellen Gene in Keratinozyten inklusive Signifikanzen ...	49
Tabelle 8: Liste aller getesteten antiviralen Gene in Keratinozyten inklusive Signifikanzen	54
Tabelle 9: Liste aller getesteten antiviralen Gene in Synoviozyten inklusive Signifikanzen	55

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich auf dem Weg unterstützt und begleitet haben.

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Stephan Meller für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die freundliche Betreuung bedanken.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Heike Hawerkamp für die unermüdliche Unterstützung und Geduld. Mit ihrer hervorragenden fachlichen Kompetenz und menschlichen Hilfe zu jeder Zeit hat sie sehr zum konstruktiven und freundlichen Arbeitsklima beigetragen. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Alina Domdey für die tolle Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung, die vielen Gespräche und all die Erinnerungen an unsere Zeit in der Dermatologie.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei meinen Freunden bedanken: Bei Annika Pliska und Efterpi-Maria Sampani für den großartigen Beistand und die wunderbare Abwechslung abseits der Doktorarbeit, und bei Aleksandar Milosevic für seinen Support. Auch bedanke ich mich bei Nina Schwarm, Miriam Schönle, Ann Christin Wittwer, Marie Herzog und Anna Enders für die Freundschaft und Unterstützung. Besonders danke ich hier Anna Enders für die Hilfe bei der Übersetzung und das Korrekturlesen.

Und von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie: Bei meinen Eltern Nicole und Christian Radau und bei meinem Bruder Fabian Radau, bei meinem Opa Dr. Reinhard Küper und Annette Mügge, sowie bei meiner Oma Ursula Küper und Dieter Gerber für den allgegenwärtigen Rückhalt und die Motivation. Während der gesamten Zeit habt ihr mich stets ermutigt und unterstützt, wo ihr konntet.