

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz

im Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung zur Bedeutung von**

**STAT3**

**in der kutanen Abwehr**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Henrike Anne Ida Müller**

aus **Münster**

Kiel **2018**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Wesch, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.18

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.07.18

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
1.1 DIE HAUT ALS GRENZFLÄCHE .....	3
1.2 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE ALS KÖRPEREIGENE ANTIBIOTIKA .....	4
1.3 STÖRUNGEN DES HAUTABWEHRSYSTEMS .....	4
1.4 STAT3 UND SEINE AUFGABEN .....	6
1.5 GRUNDÜBERLEGUNGEN DIESER ARBEIT .....	7
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>8</b>
2.1 ZELLKULTUR .....	8
2.1.1 Zellkulturmedien und –reagenzien.....	8
2.1.2 Kultivierung von primären Keratinozyten.....	8
2.2 HERUNTERREGULIERUNG VON STAT3 .....	9
2.2.1 Verwendung des STAT3-Inhibitors .....	9
2.2.2 Arbeiten mit der STAT3-siRNA.....	9
2.2.3 Verwendete Materialien.....	10
2.3 BAKTERIENKULTUR UND –STIMULATION .....	11
2.3.1 Stimulation mit lebenden Bakterien.....	11
2.3.2 Überstand von SH1000.....	12
2.4 QUANTITATIVE REVERSE-TRANSKRIPTION-POLYMERASE-KETTENREAKTION .....	13
2.4.1 RNA-Isolation .....	13
2.4.2 Reverse Transkription.....	13
2.4.3 Quantitative „real-time“ Polymerase Kettenreaktion (qPCR) .....	14
2.5 EX VIVO STIMULATION .....	16
2.6 DUALER LUZIFERASE-TEST .....	17
2.7 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....	18
2.8 DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE.....	19
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>20</b>
3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODIK.....	20
3.1.1 Vergleich verschiedener Keimstämme .....	20
3.1.2 Induktion von IL-17C und AMPs in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen.....	21
3.1.3 Effektivität der STAT3-siRNA bei Stimulation mit <i>S. aureus</i> .....	23
3.2 WIRKUNG VON STAT3 ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR FÜR IL-17C, HBD-3, RNASE 7 UND PSORIASIN .....	25
3.2.1 Die STAT3-Abhängigkeit von IL-17C .....	25

3.2.2	<i>hBD-3 und die Abhängigkeit von STAT3</i>	29
3.2.3	<i>Untersuchungen zur STAT3-Abhängigkeit von RNase 7</i>	33
3.2.4	<i>Psoriasis im Zusammenhang mit S.aureus und die Abhängigkeit von STAT3</i>	35
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>37</b>
4.1	STAT3 UND SEINE BEDEUTUNG IN DER KUTANEN ABWEHR	37
4.1.1	<i>Molekulares Verständnis des HIES</i>	37
4.1.2	<i>Steuerung der kutanen Abwehr und Rolle von IL-17C</i>	38
4.1.3	<i>Die Rolle von RNase 7 und hBD-3 in der Abwehr von S. aureus beim HIES</i>	39
4.1.4	<i>Wirkung von Psoriasis bei der Infektion mit S. aureus</i>	41
4.1.5	<i>Schlussfolgerung</i>	42
4.2	ASPEKTE FÜR DIE HIES-THERAPIE UND AUSBLICK	43
4.3	ARBEIT MIT BIOLOGISCHEN MATERIALIEN	45
4.3.1	<i>Zellkultur</i>	45
4.3.2	<i>Ex vivo Versuche</i>	45
4.3.3	<i>Statistische Auswertung</i>	46
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>48</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
μ	mikro
AMPs	Antimikrobielle Peptide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fab	Antigen-binding Fragment
Fc	crystallisable fragment
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
Genta	Gentamycin
h	Stunde
hBD-3	Humanes beta Defensin 3
HIES	Hyper-IgE-Syndrom
IL-6	Interleukin-6
IL-17C	Interleukin-17C
INF-γ	Interferon-gamma
JAK	Janus-Kinase
KGM 2	Keratinocyte Growth Medium 2 (Zellkulturmedium)
KO-ÜS	Kontroll-Überstand
l	Liter

---

---

m	mili
M	molar
n	nano
NF-κB	Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
ns	Nicht signifikant
OD	optische Dichte
Oligo (dT)	Desosythyminde
P	Phosphat
PAMPS	pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphat Buffered Saline ( Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PRR	pattern recognition receptors
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase 7	Ribonuklease 7
mRNA	messenger RNA
RP38	Ribosomales Protein 38
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Chain-Reaction
siRNA	small interfering RNA
<i>S. aureus, SA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STATTIC	Stat three inhibiting compound
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TLRs	toll-like Rezeptoren
TSB	Tryptic Soy Broth
ÜN	Über Nacht
ÜS-SH1000	Überstand von SH1000

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Haut als Grenzfläche

Die Haut ist permanent einer Vielzahl von potenziell pathogenen Keimen ausgesetzt und als riesige epitheliale Grenzfläche eine der ersten Barrieren des Körpers, die mit Mikroorganismen in Kontakt kommt. Unsere Umwelt beherbergt ein großes Reservoir an potenziellen Pathogenen, die vermögen in den Körper einzudringen. Ein Beispiel ist das grampositive Bakterium *Staphylococcus (S.) aureus*, das neben Hautinfektionen auch schwerwiegende systemische Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis, Osteomyelitis und Sepsis hervorrufen kann (McCaig *et al.*, 2006; Krishna und Miller, 2012). Zum Schutz vor solchen Bakterien ist eine kompetente Immunabwehr von existentieller Bedeutung. Gesunde Haut hat nur selten Infektionen, da die Hautzellen neben ihrer strukturgebenden Aufgabe auch immunologische Aktivität haben (Salmon *et al.*, 1994).

Es stehen physikalische und zelluläre Abwehrstrategien zur Verfügung. Die physikalische Barriere stellt das *Stratum corneum* dar. Während der Differenzierung der Keratinozyten bilden diese Lipide, die die zellulären Zwischenräumen der Haut abdichten (Proksch *et al.*, 2008).

Falls ein Pathogen die physikalischen Schutzelemente überwindet, kann es von den Hautzellen erkannt werden. Bestimmte Bakterienbereiche (PAMPS = „pathogen associated molecular patterns“) können von spezialisierten Rezeptoren (PRR = „pattern recognition receptors“) z.B. „toll-like“ Rezeptoren (TLRs) erkannt werden. Die Bindung an diese Rezeptoren setzt vielfältige assoziierte intrazelluläre Signalwege in Kraft, wodurch eine umfassende Immunantwort entsteht (Basset *et al.*, 2003; Medzhitov und Janeway, 1997).

Diese Immunantwort besteht aus der Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Komplementfaktoren, die wiederum B- und T-Zellen aktivieren können (Tosi, 2005). Ein Zytokin, das in dieser Arbeit eine Rolle spielt, ist Interleukin-17C (IL-17C). IL-17C ist ein Interleukin der IL-17-Gruppe (Li *et al.* 2000), welche auch bei T-Helferzellen als Zytokine der  $T_{H17}$ -Zellen eine wichtige Rolle spielen (Harrington *et al.*, 2005; Hirahara *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2005). Keratinozyten können nach Kontakt mit Bakterien sehr schnell IL-17C bilden und somit die Abwehrreaktion der Haut initiieren (Ramirez-Carrozzi *et al.*, 2011).

## 1.2 Antimikrobielle Peptide als körpereigene Antibiotika

Einen Teil der Abwehrreaktion von epithelialen Grenzflächen wie der Haut oder dem Darm stellt die konstitutive und induzierbare Sekretion von kleinen kationischen, antimikrobiellen Peptiden (AMPs) dar (Boman, 1995; Gallo, 2011). Diese evolutionär sehr alte Komponente des Immunsystems existiert in fast allen primitiven Lebensformen bis hin zum Menschen (Wiesner und Vilcinskis, 2010). Unter AMPs wird eine heterogene Gruppe von Peptiden zusammengefasst, die auch als körpereigene Antibiotika bezeichnet werden. Über die Jahrzehnte wurden nach und nach immer mehr solcher Peptide auf der Haut isoliert (Nakatsuji und Gallo, 2012).

Zu den AMPs, die in dieser Arbeit eine Rolle spielen, gehören die humanen beta-Defensine (hBD-3), Ribonukleasen (RNase 7) und Psoriasin (S100A7). hBD-3 hat hauptsächlich die Fähigkeit gram-positive Bakterien abzuwehren und hat eine hohe Wirkstärke gegen *S. aureus* (Harder et al., 2001; Sawamura et al., 2005). RNase 7 ist ein konstitutionell ausgeschüttetes AMP, das hohe antimikrobielle Aktivität hat (Harder and Schröder, 2002) und auch eine gute Wirksamkeit gegen *S. aureus* aufweist (Simanski et al., 2010). Psoriasin schließlich hat das Potenzial *Escherichia (E.) coli* abzuwehren (Gläser et al., 2005).

Keratinocyten können Bakterien über ihre PRRs erkennen und sind in der Lage eine eigene Immunantwort zu aktivieren. Sie sezernieren induzierbare AMPs wie hBD-3 und vermehren die Sekretion der permanent gebildeten AMPs (Harder et al., 2013). Die Wirkungsweisen der AMPs sind noch nicht abschließend geklärt. Unter anderem können sie durch ihren kationischen und amphiphilen Charakter mit der negativ geladenen Membran der Bakterien interagieren und so deren Integrität zerstören (Oren und Shai, 1998; Wiesner und Vilcinskis, 2010).

## 1.3 Störungen des Hautabwehrsystems

In bestimmten Situationen oder auch bei genetischen Defekten kann es jedoch trotz dieses kompetenten, angeborenen Immunsystems zu Infektionen mit Pathogenen auf der Haut kommen. Ein Beispiel für ein geschädigtes Immunsystem ist das Hyper-IgE-Syndrom (HIES). Erstmals beschrieben wurde dieser primäre Immundefekt im Jahre 1966 als über zwei Patientinnen mit wiederkehrenden Hautinfektionen mit *S. aureus* berichtet wurde (Davis et al., 1966). Daraufhin wurde herausgefunden, dass das HIES eine multisystemische Erkrankung ist mit unterschiedlicher Ausprägung von Pathologien des Skeletts, der Zähne, des Gesichts sowie Störungen des Immunsystems (Grimbacher et al., 1999a). Die immunologischen und infektiösen Symptome zeigen sich als Ekzeme, Abszesse, Pneumonien, Infektionen



mit Bakterien oder Pilzen, Eosinophilie und erhöhten IgE-Level im Serum (Grimbacher et al., 1999a). Diese können durch ein Scoring-System objektiviert werden (Grimbacher et al., 1999b).

Die Diagnose des HIES wird meist schon im Kindesalter gestellt. Die Kinder fallen im Neugeborenenalter durch Ausschläge auf (Minegishi und Karasuyama, 2009) und oftmals sind andere Familienmitglieder betroffen. Alternativ sollte die Diagnose in Betracht gezogen werden bei wiederkehrenden Lungenentzündungen durch *S. aureus* und auffälligen pathognomonischen kalten Hautabszessen, die nicht im Zusammenhang mit einer atopischen Genese stehen. Diese Abszesse sind gefüllt mit Eiter und immer bewachsen mit *S. aureus* (Erlewyn-Lajeunesse, 2000). *S. aureus* ist ein Bakterium, das bei den Infektionen von HIES-Patienten eine große Rolle spielt. In gesunder Haut kann dieses Bakterium meist durch AMPs abgetötet werden (Köten et al., 2012). Zusätzlich bestehen Furunkel im Gesicht und ein schwerer Hautausschlag, der mit Juckreiz und Lichenifikation einhergeht und für eine atopische Genese ansonsten eher untypisch ist (Erlewyn-Lajeunesse, 2000).

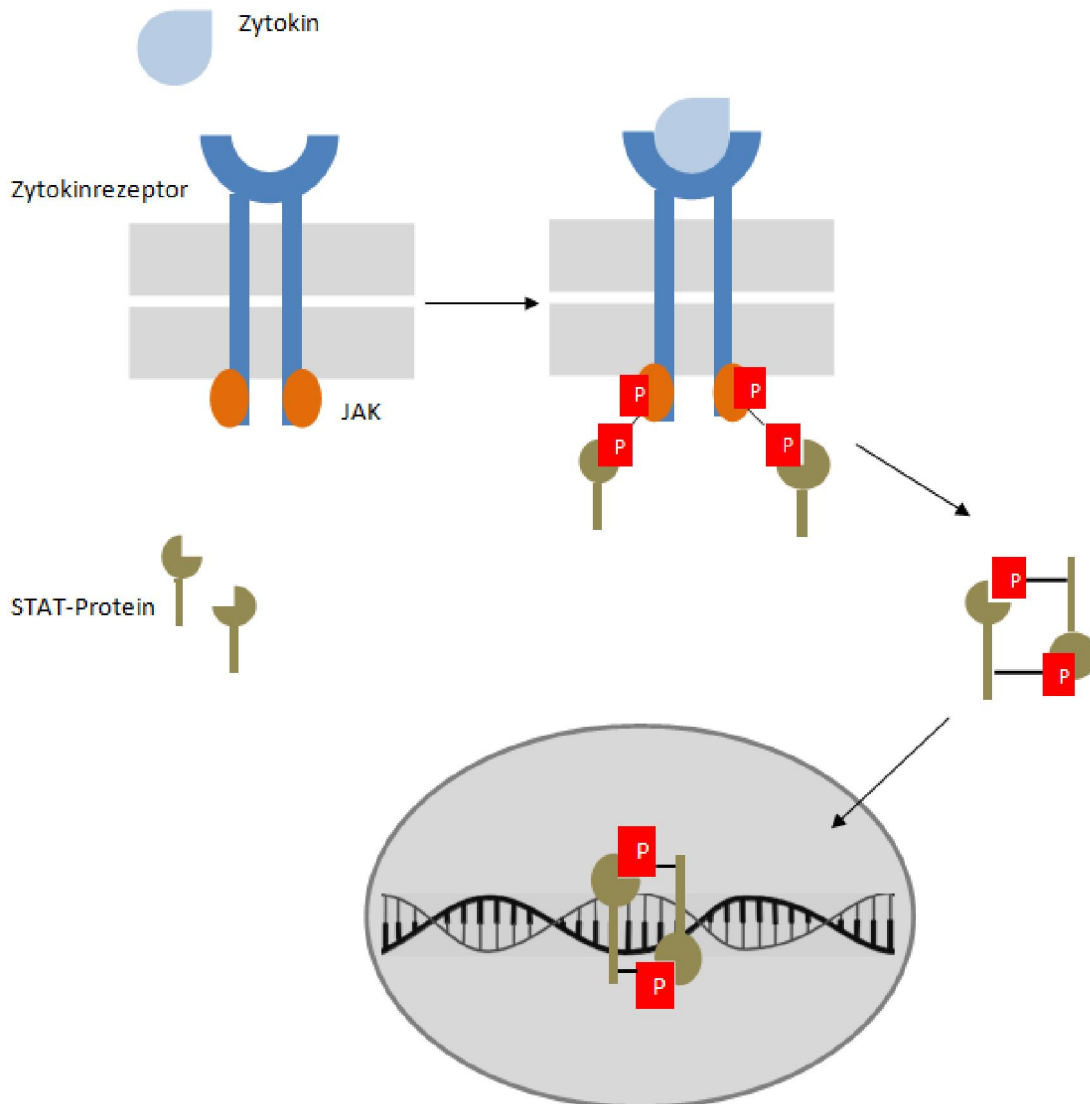
Schon von Anfang an wurde eine genetische Komponente der Erkrankung diskutiert und sporadische, autosomal dominante und rezessiv vererbte Fälle unterschieden. Dabei fiel auf, dass bei der rezessiven Form die Knochen- und Zahnsymptome fehlen, dafür aber Infektionen mit *Molluscum contagiosum*, *Herpes simplex*-Virus und Vaskulitiden im Vordergrund stehen (Grimbacher et al., 2005).

Lange Zeit wurde kein Krankheitsgen gefunden. Es gab jedoch schon längere Zeit Anhaltspunkte für einen Defekt auf Chromosom 4q (Grimbacher et al., 1999b). In einer kleineren Studie gab es dann erste Hinweise auf einen Defekt im STAT3-Gen („signal transducer and activator of transcription 3“) und für die rezessive Form für einen Defekt in der Tyrosin-Kinase 2 (Minegishi et al., 2007).

Schließlich wurde eine größere Studie mit HIES-Patienten und ihren Familien durchgeführt. Hierbei wurde die Zytokinproduktion von unstimulierten und stimulierten Leukozyten verglichen und festgestellt, dass die Patienten mehr proinflammatorische Moleküle (TNF-alpha, Interferon-gamma) nach Stimulation produzierten, wobei jedoch keine gesteigerten Effekte über den Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptor ausgelöst werden konnten. Daraus wurde geschlossen, dass es sich um eine Mutation im STAT3-Gen handeln könnte, welches im IL-6 Signalweg eine Rolle spielt (Zhong et al., 1994). STAT3 wurde daraufhin bei den Studienteilnehmern sequenziert. Dabei wurde herausgefunden, dass bei allen Patienten eine Mutation im STAT3-Gen entweder in der DNA-bindenden- oder in der SH<sub>2</sub>-Domäne besteht (Holland et al., 2007).

## 1.4 STAT3 und seine Aufgaben

STAT3 übernimmt in vielen Signalwegen eine Schlüsselrolle und dient als Transkriptionsfaktor der Aktivierung verschiedener Gene und somit nachfolgender Abwehrmechanismen. In Abbildung 1 wird der STAT3-Signalweg dargestellt.



**Abbildung 1. STAT-3 Signalweg modifiziert nach Müller-Esterl.** Die Aktivierung von STAT3 erfolgt durch verschiedene Zytokine zum Beispiel durch IL-6 und epidermal growth factor (EGF) (Zhong et al., 1994). Durch Zytokinbindung dimerisiert der nach extrazellulär gerichtete Zytokinrezeptor und die Signalkaskade wird in Gang gesetzt. Eine assoziierte Janus-Kinase (JAK) wird dadurch aktiviert (Ihle und Kerr, 1995) und phosphoryliert (P) einen Tyrosinrest des Rezeptors, sodass eine Andockstelle für STAT3 gebildet wird (Imada und Leonard, 2000). Zytoplasmatisches STAT3 bindet an den Rezeptor und wird durch die JAK an einem Tyrosinrest phosphoryliert und transloziert nach Dimerisierung in den Zellkern, um bestimmte Gene zu aktivieren (Darnell et al., 1994). STAT3 ist in der frühen Embryonalphase von Mäusen von existentieller Bedeutung, da Mäuse, in denen das STAT3-Gen ausgeschaltet wurde, nicht lebensfähig waren (Takeda et al., 1997).

## 1.5 Grundüberlegungen dieser Arbeit

HIES-Patienten haben durch die STAT3-Mutation eine Vielzahl von unterschiedlichen Symptomen. Bis jetzt konnten noch nicht alle dieser Symptome einem genauen immunologischen Mechanismus zugeordnet werden. Ein Aspekt der Immundefizienz ist, dass T<sub>H17</sub>-Zellen in ihrer Entwicklung und Wirkungsweise auf STAT3 angewiesen sind (Mogensen, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass HIES-Patienten weniger T<sub>H17</sub>-Zellen bilden (Milner et al., 2008). T<sub>H17</sub>-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von potenziellen Pathogenen und es konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass HIES-Patienten weniger T<sub>H17</sub>-assoziierte Zytokine wie IL-22 und IL-17A bilden. Gerade diese Zytokine spielen in der Aktivierung von primären Keratinozyten eine wichtige Rolle und sind in der Lage in den Keratinozyten AMPs zu induzieren (Minegishi et al., 2009).

Dabei bleibt die Frage offen, ob beim HIES zusätzlich zu einer gestörten T<sub>H17</sub>-Zellfunktion auch die Keratinozyten direkt durch die STAT3 Mutation betroffen sind und die Induktion von Abwehrmolekülen wie AMPs defekt ist. Daher wurde in dieser Doktorarbeit untersucht, inwiefern STAT3 in der Signalübertragung von AMPs in Keratinozyten nach Stimulation mit *S. aureus* eine Rolle spielt.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Die durchgeführten Versuche basieren zum größten Teil auf dem Grundsatz der Zellkultur. Nachfolgend werden zunächst die verwendeten Materialien tabellarisch (Tabelle 1) und danach die Vorgehensweise für die Kultivierung der Zellen beschrieben.

#### 2.1.1 Zellkulturmedien und –reagenzien

Materialien	Bezogen von
Zellkulturflaschen, Zellkulturlochplatten	Corning incorporated, Corning, New York
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) low Glucose	Lonza, Köln
Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Keratinocyte Growth Medium (KGM2)	PromoCell, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg
Calciumchlorid	PromoCell, Heidelberg
L-Glutamine	Life Technologies, Darmstadt
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Bio West, Nuaille, Frankreich
Trypsin/ EDTA	Biochrom, Berlin

Tabelle 1 Zellkulturmaterialien

Es wurden kollagenisierte Zellkulturflaschen und Zellkulturlochplatten von „Corning Incorporated“ verwendet. Das Zellkulturmedium KGM2 wurde mit dem „Supplement Mix“ und je nach Bedarf zusätzlich mit Calciumchlorid und Penicillin/Streptomycin vermischt.

#### 2.1.2 Kultivierung von primären Keratinozyten

Die primären Keratinozyten wurden von PromoCell bezogen. Für eine lange Haltbarkeit wurden die Zellen in einem Stickstofftank gefroren gelagert und für den jeweiligen Gebrauch aufgetaut. Dabei wurde ein Röhrchen mit Zellen in mehrere Zellkulturflaschen überführt. Sobald die Konfluenz der Zellen über 80-90 % betrug konnten sie weiter subkultiviert werden.

Zur Ablösung der adhärenz wachsenden Zellen wurden 5 ml Trypsin-EDTA aufpipettiert und circa fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die vollständige Ablösung wurde durch mikroskopische Kontrolle überprüft. Daraufhin wurde die Trypsinisierung mit 10 ml FCS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 200 g für fünf Minuten entstand ein Zellpellet, welches nach Verwerfen des Überstandes in KGM aufgenommen und in neue Flaschen oder in 12-Loch-Platten überführt wurde. Dafür wurden zuvor in den Flaschen jeweils 10 ml KGM2 und in den Platten 500 µl KGM2 vorgelegt und in die Flaschen jeweils 1 ml und in die Platten 500 µl Zellsuspension hinzugefügt. Durch vorsichtiges Rütteln und durch mikroskopische Kontrolle wurde die gleichmäßige Verteilung der Zellen sichergestellt. Bis zum Erreichen der erforderlichen Konfluenz für die Weiterbehandlung wurden die Zellen im 37 °C Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt und jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Das Aufteilen der Keratinozyten konnte jedoch nicht mehr als sechsmal wiederholt werden, da sich die Zellen ansonsten zu sehr differenziert hätten.

## **2.2 Herunterregulierung von STAT3**

Zur *in vitro* Herunterregulierung von STAT3 wurden zwei verschiedene Wege gewählt. Die dafür verwendeten Materialien werden in Tabelle 2 aufgeführt.

### **2.2.1 Verwendung des STAT3-Inhibitors**

Die Aktivität von STAT3 wurde auf Proteinebene durch einen STAT3-Inhibitor heruntersetzt. Dieser wurde einerseits von der Firma Merck bezogen und drei Stunden vor Stimulationsstart 1 : 750 verdünnt ins Medium gegeben. Als Kontrolle wurde DMSO, worin der Inhibitor gelöst war, in gleicher Konzentration eingesetzt. Der Inhibitor verhindert die Dimerisierung des STAT3-Moleküls, die DNA-Bindung und die Aktivierung der Transkription (Siddiquee et al., 2007).

Andererseits wurde für die *ex vivo*-Versuche und für die Luziferase-Versuche mit dem STAT3-Inhibitor Stattic von der Firma Enzo gearbeitet. Dieser wurde 1 : 5000 verdünnt eingesetzt und ebenfalls DMSO als Kontrolle in gleicher Verdünnung benutzt. Stattic inhibiert selektiv die Aktivierung, Dimerisierung und Translokation in den Zellkern von STAT3 (Schust et al., 2006).

### **2.2.2 Arbeiten mit der STAT3-siRNA**

Neben der Inhibition auf Proteinebene wurde posttranskriptional auf RNA-Ebene durch eine small interfering RNA (siRNA) die STAT3-Genexpression gehemmt. Die STAT3-siRNA wurde von zwei

verschiedenen Firmen eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen bei einer Konfluenz zwischen 40 % und 60 % mit Hilfe des Transfektionsreagenzes HiPerfect transfiziert. Pro Zellplattenloch wurden 100 µl KGM ohne Supplements und Antibiotikum, 1,5 µl HiPerfect und 0,3 µl siRNA (10 nM) verwendet. Die drei Bestandteile wurden vorsichtig gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass das HiPerfect mit der siRNA Komplexe bildete, die in die Zellen diffundieren konnten. Der Ansatz wurde vorsichtig zum vorgelegten Medium (400 µl KGM ohne Antibiotikum) hinzuge tropft. Die Kontroll-siRNA wurde in gleicher Weise transfiziert.

### 2.2.3 Verwendete Materialien

Inhibitor	Bezogen von
In Solution STAT3-Inhibitor VI 50 mM	S3I-201 Merck, Darmstadt
Stattic 100 mM	Enzo, Lausen, Schweiz
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<b>siRNA</b>	
STAT3_7	S102662338 Qiagen, Hilden
Allstars (negativ Kontrolle)	Qiagen
STAT3	S743 Ambion, Life Technologies, Darmstadt
Silencer siRNA (negativ Kontrolle)	Ambion
HiPerfect (Transfektionsreagenz)	Qiagen

**Tabelle 2 STAT3-Inhibition**

## 2.3 Bakterienkultur und –stimulation

### 2.3.1 Stimulation mit lebenden Bakterien

Es wurde mit den Stämmen *S. aureus* 8325-4 und SH1000 gearbeitet. Beide sind Derivate aus dem Vorläuferstamm *S. aureus* NCTC 8325 (O'Neill, 2010). Die Keime wurden bei -80 °C gelagert und vor Gebrauch über Nacht im TSB-Medium unter Agitation bei 37 °C kultiviert. Die verwendeten Materialien für die Bakterienkultur sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Für die Stimulation wurde der jeweilige Keim in neues TSB-Medium überimpft, sodass er bis in die logarithmische Phase hochwachsen konnte. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,3 wurde der Keim fünf Minuten bei 750 g zentrifugiert und das entstandene Pellet einmal mit PBS gewaschen und durch Vortexen mit dem PBS vermischt. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten bei 750 g wurde das Pellet in KGM aufgenommen und mit Hilfe einer photometrischen Messung die Konzentration durch Verdünnung mit KGM auf die OD von 0,2 eingestellt.

Der Keim *S. aureus* 8325-4 wurde unterschiedlich eingesetzt, um die besten Stimulationsbedingungen zu erproben. Dabei wurde einerseits 500 µl von der OD 0,2 pro Zellplattenloch eingesetzt und nach zwei Stunden Gentamycinsulfat in einer Verdünnung von 1 : 1.000 für weitere vier Stunden hinzugefügt. Andererseits wurde die Stimulation für drei Stunden durchgeführt und unter Anwesenheit von Gentamycinsulfat 1 : 1.000 verdünnt über Nacht fortgesetzt.

Als Variante wurde für die Stimulation die OD der Bakterienverdünnung von 0,2 1 : 10 und 1 : 20 verdünnt und 500 µl der jeweiligen Verdünnung auf die Zellen gegeben. Die Stimulation erfolgte über Nacht dabei ohne Gentamycin.

Zur Kontrolle der Bakterienkonzentration wurde zur Startzeit  $t_0$  die Bakterienverdünnung mit der OD von 0,2 1 : 10.000 in PSB verdünnt und auf TSB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit Hilfe des Auszählgerätes ProtoCOL der Firma Synbiosis ausgezählt.

Materialien	Bezogen von
TSB ( Tryptic Soy Broth)	Caso Broth, Sigma-Aldrich 30 g/l
Gentamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
TSB-Platten	Agarose 15 g/l, BioCell

Tabelle 3 Bakterienkulturmaterialien

### **2.3.2 Überstand von SH1000**

Zusätzlich zur Stimulation mit lebenden Bakterien wurde mit einem Überstand von SH1000 gearbeitet. Für die Erstellung des Überstandes wurde der Keim SH1000 in 8 ml TSB-Medium angeimpft und über Nacht unter Agitation bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Keim in neues TSB-Medium überimpft und für weitere drei Stunden unter Agitation bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde der Keim für fünf Minuten bei 750 g zentrifugiert und das entstandene Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten bei 750 g wurde das Pellet in KGM aufgenommen und durch Verdünnung auf eine optische Dichte von circa 0,2 eingestellt. Diese wurde dann noch einmal 1 : 2 in KGM verdünnt und 20 ml der Bakterienemulsion wurde in einem Standkolben für 24 Stunden bei 37 °C unter Agitation inkubiert. Als Kontrolle wurde 20 ml KGM ebenfalls in einem Standkolben bei gleichen Bedingungen inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine Verdünnung der Bakterienemulsion in KGM von 1 : 10 erstellt (OD = 0,06) und diese für zehn Minuten bei 8500 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde steril filtriert und für spätere Stimulationsversuche in Schraubdeckelröhrchen à 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Als Kontroll-Überstand wurde das KGM2 aliquotiert, welches ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C unter Agitation inkubiert wurde.



## 2.4 Quantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Die durchgeführten Versuche wurden mittels quantitativer RT-PCR ausgewertet. So bezeichnet man die Kombination aus Reverser Transkription mit angeschlossener Polymerase-Kettenreaktion. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte dieses Verfahrens aufgeführt.

### 2.4.1 RNA-Isolation

Zur Analyse der Transkriptionsaktivität von verschiedenen Genen der Zelle wurde zunächst die RNA isoliert. Tabelle 4 zeigt die verwendeten Materialien. Die Isolation erfolgte mit 500 µl Chrystal RNA magic pro Zellplattenloch. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert und mit 100 µl Chloroform in einem Schraubdeckelröhrchen durchmischt. Durch die Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g entstanden drei Phasen. Die oberste Phase wurde abgenommen und in neuen 1,5 µl Röhrchen mit 250 µl Isopropanol vermischt. Für die RNA Präzipitation wurden die Proben bei Raumtemperatur für zehn Minuten stehen gelassen. Zur Separierung der RNA schloss sich eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g an. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgekippt und das gelartige Pellet zweimal mit 500 µl Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das RNA-Pellet in 16,5 µl RNase-freies Wasser aufgenommen und mit dem Nano Drop 1000 die Konzentration der verschiedenen Proben gemessen.

Materialien	Bezogen von
Chrystal RNA magic	Biolab products, Gödensdorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 4 Reagenzien für die RNA-Isolation

### 2.4.2 Reverse Transkription

Die instabile RNA wurde nach der Isolation in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um eine dauerhafte Analysemöglichkeit zu erzeugen. Dies wurde durch eine reverse Transkriptase ermöglicht, die in der Lage ist aus einer RNA Vorlage DNA zu synthetisieren (Gallo, 1971). Introns und Promoter fehlen bei der cDNA, da diese nur aus den transkribierten Teilen der genomischen DNA besteht. Die verwendeten Materialien für die reverse Transkription sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Der Ansatz für die reverse Transkription beinhaltet 1 µl oligo(dT), 1 µl dNTP, 5 µl H<sub>2</sub>O sowie RNA und H<sub>2</sub>O berechnet nach der RNA Konzentration (insgesamt 15,75µl pro Probe).

Dieser Ansatz wurde im Thermocycler für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt und dann auf 4 °C heruntergekühlt. Zu jeder Probe wurden anschließend 4 µl 5xRT-Buffer und 0,25 µl Maxima Reverse Transkriptase hinzugefügt und daraufhin wurden sie für dreißig Minuten auf 60 °C erhitzt. Schließlich wurde die Temperatur für die letzten 5 min auf 85 °C erhöht und dann auf 4 °C heruntergekühlt. Die Proben wurden mit 80 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab.

<b>Materialien</b>	<b>Bezogen von</b>
Maxima Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
5x Reverse Transkriptase Puffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Oligo (dt), t(18)	Sigma Aldrich
dNTP Mix, 100 mM	BioLine, Luckenwalde

**Tabelle 5 Reagenzien für die Reverse Transkription**

### **2.4.3 Quantitative „real-time“ Polymerase Kettenreaktion (qPCR)**

Nach Abschluss der reversen Transkription wurde die qPCR angeschlossen. Das Umschreiben der RNA in cDNA ist dabei unumgänglich, da mit der PCR nur DNA amplifiziert und quantifiziert werden kann (Delidow et al., 1996). Es wurden Intron-überspannende Primer (Tabelle 6) benutzt, um cDNA von genomischer DNA verlässlich unterscheiden zu können. Grundsätzlich finden bei der PCR drei wichtige Schritte statt, die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden. Diese drei Schritte beinhalten die Denaturierung der doppelsträngigen DNA, das Binden der beiden spezifischen Primer (Annealing) an je einen Einzelstrang und schließlich die enzymatische Amplifizierung der Primer durch die hitzestabile *Taq* DNA Polymerase (Elongation) (Delidow et al., 1996).

Die PCR wurde als touchdown PCR durchgeführt, bei der nach der Anfangsdenaturierung bei 95 °C für dreißig Sekunden die Elongationstemperatur pro Zyklus von 66 °C um 1 °C bis auf 60 °C herabgesetzt wurde. Nach diesen sechs Zyklen folgten weitere vierzig Zyklen mit einer Elongationstemperatur von 60 °C. Jeder Zyklus begann mit einer fünf Sekunden dauernden Denaturierung bei 95 °C.

In eine 96-Loch-PCR Platte wurden pro Vertiefung 5,2 µl SYBR Premix Ex Taq, 3 µl H<sub>2</sub>O und je 0,4 µl des vorwärts und rückwärts Primers pipettiert. Danach wurde 1 µl der zu testenden cDNA in die jeweiligen Vertiefungen hinzugefügt. Schließlich wurde die Platte mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und

für eine Minute bei 200 g zentrifugiert. Zur Analyse wurde das PCR Gerät „Thermal Cycling Step One Plus“ mit der oben beschriebenen Zyklusabfolge genutzt. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Materialien.

Zur Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte wurde das SYBR green Reagenz benutzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert doppelsträngige DNA und die Messung der Fluoreszenz am Ende jedes Zyklusses ermöglicht Rückschlüsse auf die Ursprungsmenge an cDNA. Der Cyanin-Farbstoff ist hitzestabil, selektiv für doppelsträngige DNA und sehr sensitiv (Zipper et al., 2004).

Die Spezifität der entstandenen Produkte wurde durch die Schmelzkurvenanalyse sichergestellt. Eine Standardkurve für jedes Primerpaar ermöglichte die Bestimmung der cDNA Mengen. In Relation zum konstant exprimierten „house keeping gene“ RP38 konnte erfasst werden, ob die untersuchten Gene in Relation zur Grundexpression der Zelle induziert wurden. Die Benutzung eines „house keeping gene“ ist der Goldstandard zur Reduzierung von biologischen Schwankungen bei der Interpretation der PCR (Bär et al., 2009).

<b>Primer</b>	<b>Orientierung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
RP38	f1	TCAAGGACTTCCTGCTCACA
	r1	AAAGGTATCTGCTGCATCGAA
hBD-3	f3	TGTTTGCTTTGCTCTCCTGT
	r3	CGCCTCTGACTCTGCAATAA
Psoriasis	vof1	AGACGTGATGACAAGATTGAC
	vor1	TGTCCTTTTTCTCAAAGACGTC
RNase 7	S2-31	GGAGTCACAGCACGAAGACC
	S2-33 rev	CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA
STAT3	f	CTGCTCCAGGTACCGTGTGT
	r	CCTCTGCCGGAGAAACAG
IL-17C	f1	CTCAGCTACGACCCAGTGC
	r1	AAGGCCAGCTTCTGTGGATAG

**Tabelle 6** Verwendete Primer für die „real-time“ PCR

Materialien	Bezogen von
SYBR Premix Ex Taq II	Takara Bio Europe/ Clontech, Saint-Germain en-Laye, Frankreich
96er CRYSTAL PCR Platte 12-10-0910C	Biolab products
Micro AMP Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
PCR System Thermal Cycling Step One Plus	Applied biosystems life technologies Serial Numer: Base 272005139

Tabelle 7 Materialien für die „real-time“ PCR

## 2.5 *Ex Vivo* Stimulation

Zum besseren Verständnis der Verhältnisse in menschlicher Haut wurden Versuche mit Hautbiopsien durchgeführt. Die Biopsien wurden vorpräpariert und überschüssiges Fett und Teile der Dermis entfernt. Daraufhin wurden kleine Hautstückchen à 5 x 5 mm geschnitten. Für die Dauer von einer Stunde wurden die Hautstückchen in Röhrchen mit 350 µl KGM gegeben, worin der STAT3-Inhibitor STATTIC und zur Kontrolle DMSO in der Konzentration 1 : 5000 verdünnt war. Danach wurden die Hautstückchen in neue Röhrchen überführt. In den Röhrchen war je nach Schema für die Stimulation ein Überstand von SH1000 mit der dazugehörigen Kontrolle 1 : 10 verdünnt und der STAT3-Inhibitor STATTIC bzw. DMSO 1 : 5000 verdünnt.

Nach der Stimulation über Nacht erfolgte die Aufarbeitung der Proben. Die Hautexzisate wurden dafür zunächst in 300 µl RNAlater bei -20 °C gelagert.

Zur RNA-Isolation wurden die Hautstückchen aus dem RNAlater entnommen und die Epidermis mit dem Skalpell in kleine Stückchen geschnitten. Die Hautschnipsel wurden dann in ein Lysisröhrchen mit kleinen Kügelchen gegeben mit 600 µl RPL-Puffer (aus RNeasy Kit von Qiagen) und 6 µl 2-Mercaptoethanol gegeben. Daraufhin wurde die Proben in einer Speed Mill-Zentrifuge dreimal für eine Minute zentrifugiert und so die RNA aufgeschlossen. Danach wurden die Proben drei Minuten bei 13000 g abzentrifugiert und der Überstand auf einen Qiashredder überführt. Eine weitere Zentrifugation für drei Minuten bei 13000 g diente der Homogenisierung des Lysates.

Die weitere RNA-Isolation erfolgte dann nach der Anleitung des RNeasy Mini Kit von Qiagen. In Tabelle 8 sind die verwendeten Materialien aufgezählt.

Materialien	Bezogen von
innu Speed Lysis Tube W	Biometra, Göttingen
RNAlater	Qiagen, Hilden
2 Mercaptoethonal	Roth, Karlsruhe
Qiashredder	Qiagen, Hilden
RNeasy <sup>®</sup> Mini kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 8 Aufbereitung der Hautexzisate

## 2.6 Dualer Luziferase-Test

Der duale Luziferase-Test erlaubt die Untersuchung der Promotoraktivität von ausgesuchten Zielgenen. Ein *Renilla*-Luziferase-Vektor und ein *Firefly*-Luziferase-Vektor werden gleichzeitig in die Zellen transfiziert. Der *Renilla*-Luziferase-Vektor wird unabhängig von äußeren Einflüssen grundsätzlich transkribiert und führt so zur einer konstanten Entstehung der *Renilla*-Luziferase. Die *Firefly*-Luziferase hingegen entsteht abhängig von der Promotoraktivierung des einklonierten Promotors des zu untersuchenden Zielgenes. Die *Firefly*-Luziferase-Aktivität wird dabei in Relation zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität interpretiert, da so die Transfektionseffizienz, Zelldichte und Zellaktivität mit berücksichtigt werden. Da für beide Luziferasen unterschiedliche Substrate eingesetzt werden ist diese gleichzeitige Transfektion der Vektoren möglich (Farr und Roman, 1992). Bei den durchgeführten Versuchen wurde ein ein *Firefly*-Luziferase-Vektor der Firma Promega verwendet, in den 2484 Basenpaare des hBD-3-Promotors einkloniert worden waren. Dieser hergestellte Vektor S3pGL3-2-1 wurde aus einem vorherigen Projekt ( Doktorarbeit Kai Näbert, Hautklinik Kiel) übernommen.

Für den Luziferasetest wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80% mit dem Transfektionsreagenz FuGene HD in einer 24-Loch-Platte transfiziert. Pro Vertiefung wurde 30 ng Renilla, 300 ng S3pGL3-2-1 Vektor, 1 µl FuGene HD und 100 µl KGM ohne Antibiotika und Supplements eingesetzt. Nach einer Inkubation von 15 - 30 Minuten wurde die Plasmidmischung auf die Zellen zu 250 µl vorgelegtem Medium getropft und nach sechs Stunden das Medium gewechselt. Am darauffolgenden Tag wurde dann das Medium noch einmal gewechselt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde die Stimulation mit einem Überstand von SH1000 und die STAT3-Inhibition mit dem STAT3-Inhibitor Stattic durchgeführt. Nach einer Stimulationsdauer von circa 22 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde zum Lysieren der Zellen pro Zellplattenloch

150 µl des Passiven Luysispuffer aus dem Kit von Promega 1 : 5 verdünnt eingesetzt. Die Zellkulturplatte wurde für circa 20 Minuten auf einem Wipptisch gestellt und danach bis zur Messung der Luziferase-Aktivität bei -20 °C gelagert.

Für die Messung der Luziferaseaktivität wurde das Kit von Promega benutzt und das Plattenlesegerät von Biotek (FLx800) zur Messung der Lumineszenz verwendet. Die Messung erfolgte in einer weißen 96-Loch-Platte. Aus jedem Zellplattenloch wurde 20 µl Lysat verwendet und die Messung analog zur Beschreibung von Promega durchgeführt. In Tabelle 9 sind die verwendeten Materialien aufgeführt.

Materialien	Bezogen von
Renilla Reporter Plasmid pGL4.74 hRluc/TK	Promega, Madison, USA
pGL-3-Kontroll-Vektor	Promega, Madison, USA
FuGene HD Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
Brandplates: 96-Loch-Platte (weiß, blickdicht)	Brand, Wertheim
Dual-Luziferase Reporter 1000 Assay System	Promega, Madison, USA

Tabelle 9 Materialien für den Luzifersasetest

## 2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung der Proteinmengen von IL-17C wurde das Prinzip des „Sandwich“-ELISAs genutzt. Die Zellüberstände der durchgeführten Stimulationsversuche wurden hierfür nach Beendigung der Stimulation abgenommen und für fünf Minuten bei 12000 g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue Röhrchen überführt und bei -20 °C bis zur Messung im ELISA gelagert. Als Kontrolle für den ELISA wurde parallel zu den Stimulationsversuchen die gleiche Konzentration von *S. aureus* ohne Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert und nach Zentrifugation wurde der Überstand ebenfalls bei -20°C gelagert.

Für die Durchführung des ELISAs wurde das Kit für den IL-17C DuoSet ELISA von R & D genutzt und nach den angegebenen Anweisungen durchgeführt. Für die abschließende Farbreaktion wurde abweichend vom Kit als Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB) genutzt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit dem Gerät Sunrise von Tecan bei einer Wellenlänge von 620 nm. Die verwendeten Materialien für den ELISA sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Die Konzentrationen von IL-17C der verschiedenen Proben wurden durch eine erstellte Standardkurve ermittelt, wobei sich für jede gemessene Extinktion eine jeweilige Konzentration von IL-17C ablesen ließ.

Von den dabei ermittelten Konzentrationen von IL-17C wurden die Werte der Kontrollen ohne Zellen abgezogen.

<b>Verwendete Materialien</b>	<b>Bezogen von</b>
DuoSet ELISA human IL-17C	R & D Systems, Minneapolis, USA
TMB High Sensitivity Substrate Solution	Biolegend, San Diego, USA
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Roth, Karlsruhe

**Tabelle 10 Materialien für den ELISA**

## **2.8 Darstellung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mit dem Programm Graph Pad Prism unter Benutzung des Student's T-Test. Es wurde beschrieben, dass dieser Test auch bei kleinen n-Werten und nicht nachgewiesener Normalverteilung angewendet werden kann (Winter, 2013). In der Darstellung werden die Mittelwerte bestehend aus Dreifachmessungen mit einem Fehlerbalken, der den Standardfehler zeigt, als Säulendiagramme graphisch aufgeführt. Berücksichtigt werden dabei repräsentative Ergebnisse, die durch mehrfache Experimente bestätigt wurden. Durchgeführte Wiederholungsversuche, die keine oder nicht eindeutige Ergebnisse brachten, werden nicht dargestellt.

## 3 Ergebnisse

Dieser Ergebnisteil zeigt die Abhängigkeit der Genexpression des Zytokins IL-17C und der AMPs hBD-3, RNase 7 und Psoriasin von STAT3 nach der Stimulation von Keratinozyten mit *S. aureus*.

Im ersten Teil werden die Ergebnisse der Vorversuche zur Methodik dargestellt. Zunächst wurde die Eignung der zwei verfügbaren Keimstämme in der Anregung der Keratinozyten zur Induktion von IL-17C gemessen (Abbildung 2). In einer weiteren Versuchsreihe wurde die optimale Dauer und die optimale Konzentration der Bakterien für die Stimulation der Keratinozyten überprüft, mit der möglichst hohe Induktionslevel der Abwehrmoleküle erreicht werden konnten (Abbildung 3 A-D). Schließlich wurde die Effizienz der STAT3-Hemmung durch die siRNA der Hersteller Ambion und Qiagen überprüft (Abbildung 4).

Nach den erfolgreichen Vorversuchen zur Methodik wurde dann im zweiten Teil die Rolle des Botenstoffs STAT3 für die AMPs und IL-17C im Detail überprüft. Dazu wurden die Genexpressionen von IL-17C, hBD-3, RNase 7 und Psoriasin nach Applikation von *S. aureus* mit ungehemmtem STAT3 bzw. durch siRNA oder STAT3-Inhibitor herunterreguliertem STAT3 verglichen (Abbildung 5 - Abbildung 7, Abbildung 10 - Abbildung 11, Abbildung 14 - Abbildung 19). Für IL-17C wurden darüber hinaus die Proteinkonzentrationen analysiert (Abbildung 9).

Zusätzlich wurde *ex vivo* die Abhängigkeit der Genexpression von IL-17C und hBD-3 von STAT3 bei der Stimulation mit dem Überstand von SH1000 untersucht (Abbildung 8, Abbildung 12).

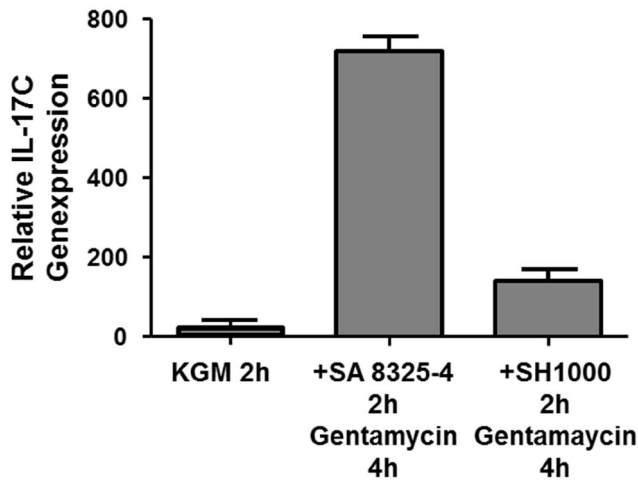
Zum besseren Verständnis der Genregulation von hBD-3 wurde schließlich die Promotoraktivierung mittels eines dualen Luziferasetestes erprobt (Abbildung 13).

### 3.1 Untersuchungen zur Methodik

#### 3.1.1 Vergleich verschiedener Keimstämme

Für die Experimente war es wichtig, Bedingungen zu schaffen, bei denen durch *S. aureus* die Keratinozyten in ausreichender Stärke stimuliert werden konnten, ohne jedoch die Keratinozyten abzutöten. Dafür wurden zunächst zwei unterschiedliche Keimstämme *S. aureus* 8325-4 und SH1000 verglichen, die beide aus dem Vorläuferstamm NCTC 8325 stammen (O'Neill, 2010), um festzustellen, welcher Stamm bessere Induktionen bedingt (Abbildung 2).





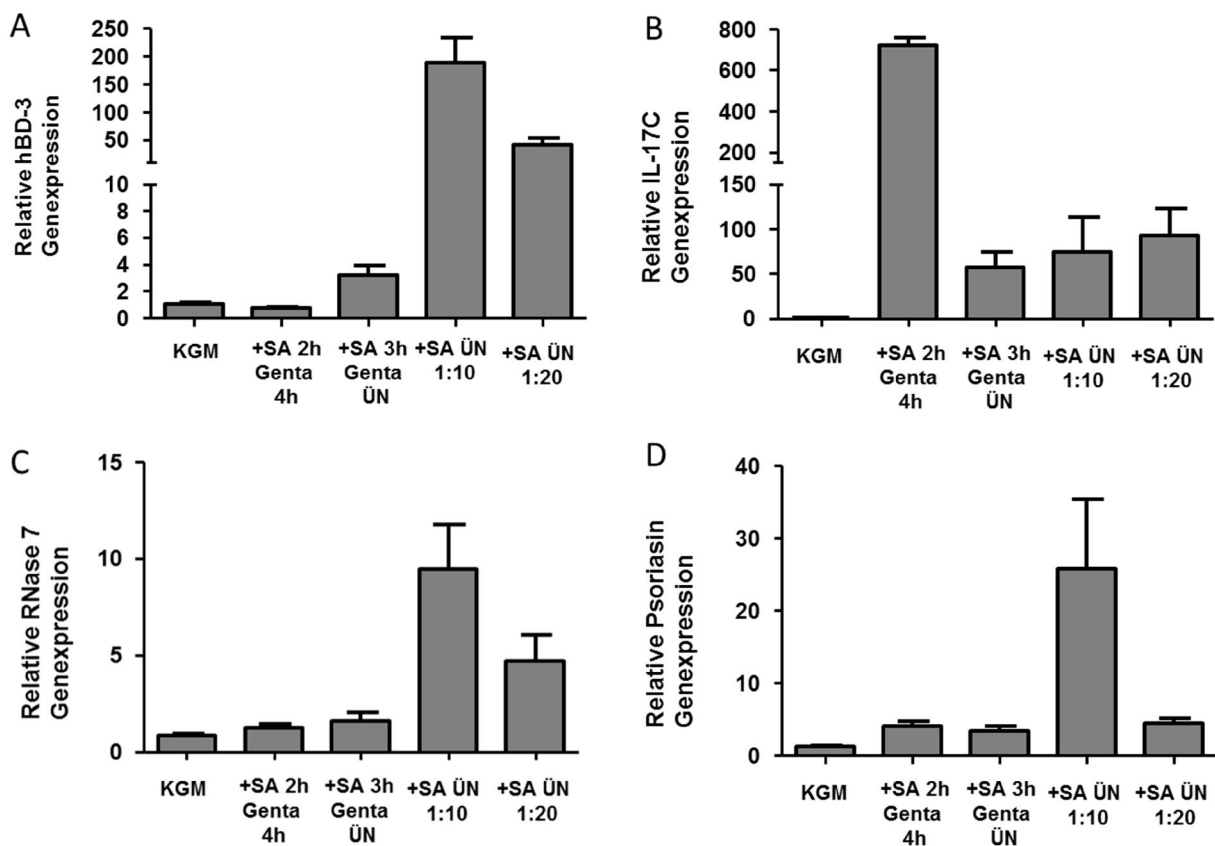
**Abbildung 2.** Die IL-17C Genexpression erfolgt effektiver mit *S. aureus* 8325-4. Konfluente Keratinozyten wurden mittels *S. aureus* 8325-4 und SH1000 zwei Stunden inkubiert und anschließend vier Stunden mit Gentamycin behandelt. Daraufhin wurde nach RNA-Isolation und reverser Transkription die IL-17C Expression mittels „real-time“ PCR gemessen. Die Abbildung zeigt die relative IL-17C Genexpression.

Aufgrund der höheren IL-17C-Induktion durch *S. aureus* 8325-4 (im Vergleich zu SH1000) wurde für die weiteren Experimente mit lebenden Bakterien dieser Keim eingesetzt. Für die Stimulationen *ex vivo* und für die Luziferaseversuche wurde ein Überstand von SH1000 genutzt.

### 3.1.2 Induktion von IL-17C und AMPs in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen

Anschließend wurden verschiedene Stimulationsbedingungen verglichen, um zu erproben bei welchen Bedingungen die Induktion der zu untersuchenden Abwehrmoleküle am höchsten war (Abbildung 3 A-D). Einerseits wurde dafür zwei Stunden mit *S. aureus* mit einer optischen Dichte von 0,2 stimuliert gefolgt von einer vierstündigen Inkubation mit Gentamycin. Außerdem wurde untersucht, ob eine dreistündige Stimulation mit *S. aureus* mit einer optischen Dichte von 0,2 und einer darauffolgenden Inkubation mit Gentamycin über Nacht (ca. 17 Stunden) zu höheren Induktionen der AMPs führte.

Vergleichend dazu wurde die Stimulation ohne Gentamycin über Nacht durchgeführt. Dabei wurde die optische Dichte der Bakterienemulsion von 0,2 nochmal 1 : 10 und vergleichend 1 : 20 verdünnt, um die Keimzahl am Versuchsstart zu reduzieren.



**Abbildung 3 A-D. Abhängigkeit der Induktion von der Stimulationsdauer und Konzentration von *S. aureus*.** *S. aureus* (SA) wurde zwei bzw. drei Stunden auf die Zellen gegeben gefolgt von einer Gentamycininkubation (Genta) von vier Stunden bzw. über Nacht. Zusätzlich wurde der Keim ohne Gentamycin über Nacht mit der optischen Dichte von 0,2 nochmals 1 : 10 bzw. 1 : 20 verdünnt eingesetzt. Die Genexpression wurde durch RNA-Isolation, reverser Transkription und „real-time“ PCR ermittelt (SA = *S. aureus*, Genta = Gentamycin, ÜN = über Nacht).

Auffällig war, dass die AMPs (A, C, D) nach einer zweistündigen Stimulation mit *S. aureus* gefolgt von einer vierstündigen Inkubation mit Gentamycin wenn überhaupt nur sehr niedrige Induktionslevel zeigten. IL-17C (B) hingegen war auf mRNA Ebene schon nach dieser kurzen Stimulationszeit hochreguliert worden. Bei der Stimulationsdauer von drei Stunden und der Inkubation mit Gentamycin über Nacht konnten nur in einigen Versuchen eine Induktion der Zielgene erzielt werden, die sich allerdings nur schwer reproduzieren ließ. Dabei wurde jedoch festgestellt, dass auch die Dauer der Postkonfluenz eine entscheidende Rolle für die Stärke der Induktion spielt.

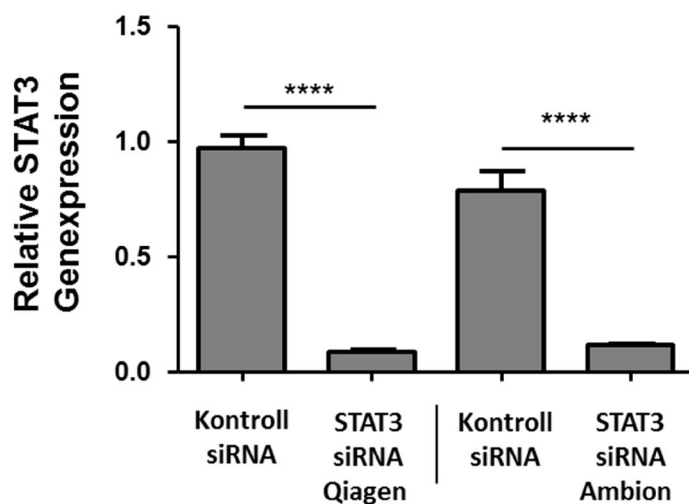
Bei der Stimulation über Nacht ohne Gentamycin konnten höhere Induktionen auch bei den AMPs erreicht werden. Vor allem bei dem für *S. aureus* relevanten AMP hBD-3 konnte die Induktion verbessert werden. Probleme ergaben sich jetzt noch für IL-17C, da bei diesen längeren Stimulationszeiträumen teilweise schwankende Induktionen erzielt wurden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Stimulationsversuche mit *S. aureus* über Nacht mit der Verdünnung 1 : 20 und drei Tagen postkonfluenten Zellen durchgeführt, da die Keratinozyten so ausreichend zur Induktion von Abwehrmolekülen angeregt wurden, ohne jedoch das Abtöten der Zellen zu riskieren. Bei der Verdünnung 1 : 10 konnten zwar höhere Induktionswerte von hBD-3 und vor allem RNase 7 beobachtet werden, allerdings waren die Keratinozyten stark angegriffen, sodass die gemessenen RP38 Konzentrationen vermindert waren. IL-17C zeigte bei der Stimulation über Nacht zwar niedrigere Konzentrationen als nach der zweistündigen Stimulation, jedoch war die Genexpression immer noch hoch genug, um eine etwaige Inhibition untersuchen zu können.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass Psoriasisin durch *S. aureus* in den Stimulationen induziert wurde. Dabei war vor allem bei der Stimulation ohne Gentamycin über Nacht und der optischen Dichte von 0,2 1 : 10 verdünnt eine ausgeprägte Konzentrationszunahme der Psoriasisin-mRNA zu messen.

### 3.1.3 Effektivität der STAT3-siRNA bei Stimulation mit *S. aureus*

Um in vitro die Mutation der Krankheit HIES nachzustellen, wurde die STAT3-Genexpression mit einer siRNA herunterreguliert. Hierfür wurden die Keratinozyten bei 40-60% Konfluenz mit der STAT3-siRNA transfiziert und bis zur Postkonfluenz weiter kultiviert. Diese war meist fünf Tage nach der Transfektion erreicht. Die Stimulation wurde wie oben beschrieben über Nacht ohne Gentamycin durchgeführt und der knock down von STAT3 wurde mittels „real-time“ PCR ermittelt (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Knock down der verwendeten siRNAs.** Die Abbildung zeigt die relative STAT3-Genexpression der mit *S. aureus* stimulierten Zellen mit der Kontroll-siRNA sowie der STAT3-siRNA von Qiagen und von Ambion. Die Werte wurden mittels „real-time“ PCR nach RNA-Isolation und reverser Transkription ermittelt. Zur Darstellung kommen die Mittelwerte der Dreierwerte von jeweils zwei Versuchen mit der siRNA der verschiedenen Firmen (\*\*\*\*p<0,0001 Student's t-Test).

Wie aus der Graphik ersichtlich ist, wurde die Genexpression von STAT3 durch die siRNA beider Firmen signifikant herunterreguliert.

## 3.2 Wirkung von STAT3 als Transkriptionsfaktor für IL-17C, hBD-3, RNase 7 und Psoriasin

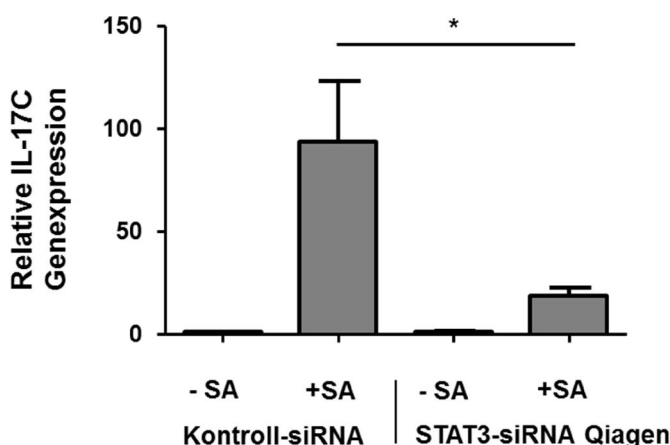
### 3.2.1 Die STAT3-Abhängigkeit von IL-17C

#### 3.2.1.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit der IL-17C Genexpression von STAT3

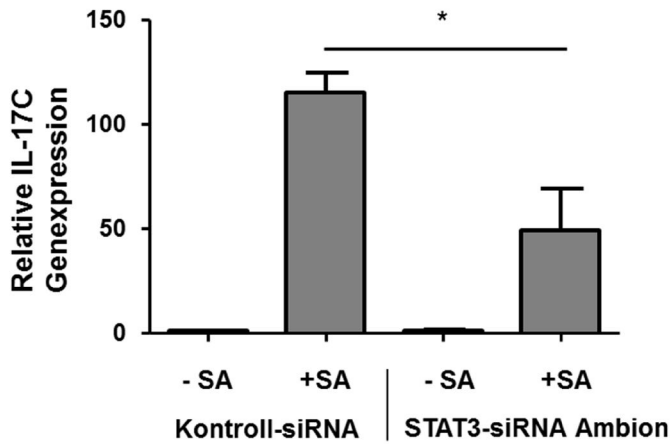
Es ist bekannt, dass  $T_{H17}$ -Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen der Haut mit *S. aureus* spielen (Krishna und Miller, 2012). Sie steuern über den IL-17-Stoffwechselweg (v.a. IL-17A) verschiedene Abwehrstrategien wie z.B. die Aktivierung von Keratinozyten zur Induktion von AMPs (Liang et al., 2006). Die Patienten mit der Krankheit HIES haben eine herabgesetzte Fähigkeit  $T_{H17}$ -Zellen zu generieren (Ma et al., 2008). Daher werden Keratinozyten zur Bildung von AMPs weniger stimuliert, weil sie auf die Zytokine der  $T_{H17}$ -Zellen angewiesen sind (Minegishi et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob neben der bekannten Problematik der herabgesetzten Aktivierung von Keratinozyten durch Zellen des erworbenen Immunsystems auch die Keratinozyten selbst als Teil des angeborenen Immunsystems durch eine STAT3-Mutation in der Induktion von Abwehrmolekülen gehindert werden. Dazu wurde zunächst IL-17C untersucht, ein Zytokin, das von Keratinozyten nach Stimulation von TLRs gebildet wird und autokrin auf die Keratinozyten wirkt (Ramirez-Carrozzi et al., 2011).

Dabei wurde die STAT3-Genexpression durch Einsatz der STAT3-siRNA von Qiagen und Ambion herunterreguliert (Abbildung 5, Abbildung 6).

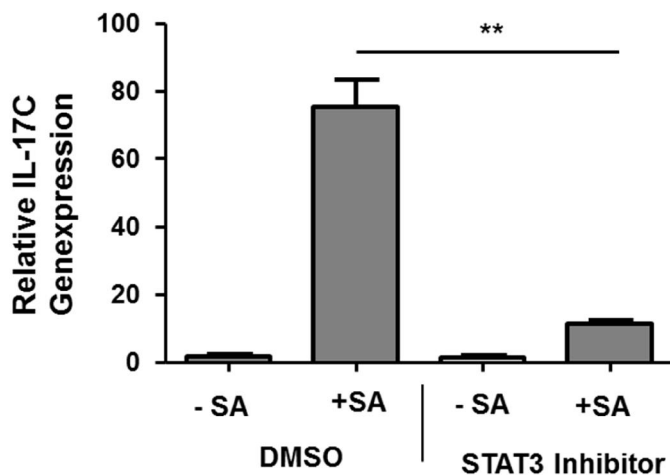


**Abbildung 5. Abhängigkeit von IL-17C von STAT3.** Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen mit der STAT3-siRNA von Qiagen. Die Stimulation mit *S. aureus* erfolgte über Nacht. Im Gegensatz zur Kontroll-siRNA war bei den Keratinozyten, die vorher mit der STAT3-siRNA behandelt wurden, nach RNA-Isolation und reverser Transkription eine signifikant geringere IL-17C cDNA-Konzentration durch die „real-time“ PCR zu messen (SA = *S. aureus*, \* $p < 0,05$  Student's t-Test).



**Abbildung 6 IL-17C ist abhängig von STAT3.** In der Abbildung dargestellt ist ein exemplarischer Versuch mit der STAT3-siRNA von Ambion. Dabei wurden die Zellen nach Transfektion mit der siRNA über Nacht mit *S. aureus* stimuliert und die Genexpression von IL-17C nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels „real-time“ PCR bestimmt (SA = *S. aureus*, \* $p < 0,05$  Student's t-Test).

Es zeigte sich, dass IL-17C signifikant weniger induziert wurde, wenn die Keratinozyten mit der STAT3-siRNA behandelt wurden. Um dieses Ergebnis zu untermauern wurden weitere Versuche mit dem STAT3-Inhibitor durchgeführt (Abbildung 7).

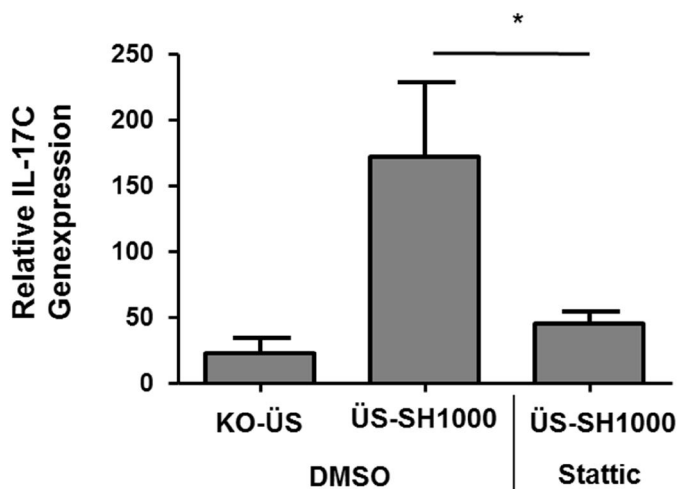


**Abbildung 7 Ergebnisse mit dem STAT3-Inhibitor und IL-17C.** Nach einer Vorinkubation von drei Stunden mit dem STAT3-Inhibitor wurden die Keratinozyten mit *S. aureus* über Nacht stimuliert. Als Kontrolle diente DMSO. Dargestellt sind die Ergebnisse eines exemplarischen Versuches aus der „real-time“ PCR. Die Ergebnisse konnten in einem weiteren Versuch (ohne Abbildung) bestätigt werden (SA = *S. aureus*, \*\* $p < 0,01$  Student's t-Test).

Die Ergebnisse der siRNA konnten unter Einsatz des STAT3-Inhibitors bestätigt werden und die STAT3-Abhängigkeit von *S.aureus*-induzierter IL-17C-Genexpression *in vitro* gezeigt werden.

### 3.2.1.2 Verhalten von IL-17C in den *ex vivo* Experimenten

Zur Annäherung an die Verhältnisse *in vivo* wurden Versuche mit Hautbiopsien durchgeführt. Dazu wurden Hautexzisate von drei unabhängigen Spendern untersucht, indem der STAT3-Inhibitor Stattic genutzt wurde und zur Stimulation ein Überstand von SH1000 verwendet wurde (Abbildung 8).

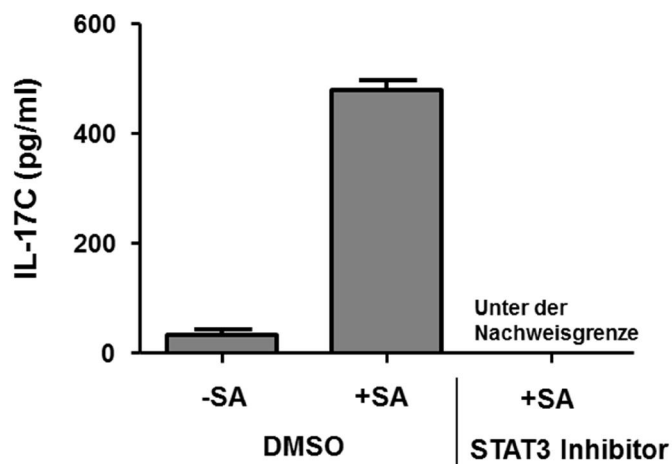


**Abbildung 8 IL-17C untersucht *ex vivo*.** Hautbiopsien von drei unabhängigen Spendern wurden präpariert und Hautstückchen von circa 5 x 5 mm mit DMSO bzw. Stattic 1 : 5000 verdünnt in 1,5 ml Röhrchen für eine Stunde vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde zusätzlich zu DMSO bzw. Stattic 1 : 5000 verdünnt ein Überstand von SH1000 1 : 10 verdünnt zur Stimulation eingesetzt. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die relative IL-17C Genexpression mittels „real-time“ PCR ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (n = 15) basierend auf den drei Spendern (KO-ÜS=Kontroll-Überstand, ÜS-SH1000=Überstand von SH1000, \*p<0,05 Student's t-Test).

Die Ergebnisse der *ex vivo* Versuche zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der Genexpression von IL-17C von STAT3.

### 3.2.1.3 Proteinuntersuchungen von IL-17C

Zur weiteren Untersuchung der STAT3-Abhängigkeit von IL-17C wurde mittels ELISA die Proteinkonzentrationen von IL-17C bei der Stimulation mit *S. aureus* und dem STAT3-Inhibitor ermittelt.



**Abbildung 9 Proteinkonzentrationen von IL-17C.** Nach einer Vorinkubation von drei Stunden mit dem STAT3-Inhibitor bzw. DMSO wurden die Keratinozyten mit *S. aureus* über Nacht stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden daraufhin im ELISA gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines exemplarischen Versuches. Die Werte ergeben sich aus den Probenkonzentrationen abzüglich der Werte der Kontrollen ohne Zellen, sodass die IL-17C Konzentration der Überstände der Zellen behandelt mit dem STAT3-Inhibitor unter die Nachweisgrenze fiel (SA = *S. aureus*).

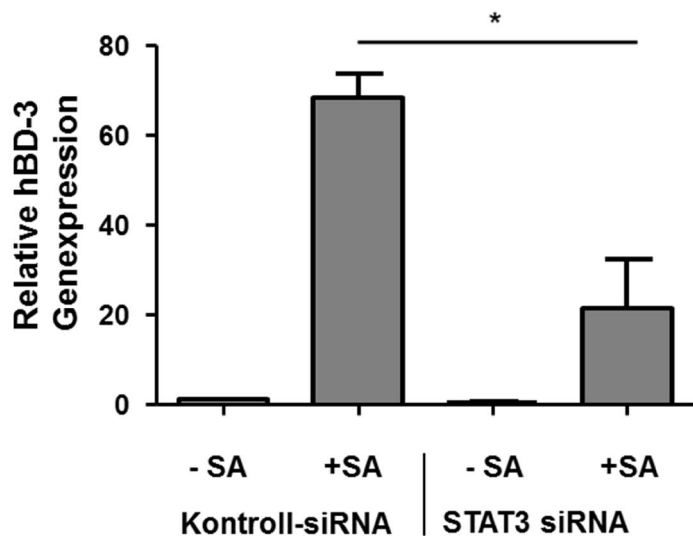
Wie in der Abbildung 9 erkennbar ist die Proteinkonzentration von IL-17C vermindert in den Proben, die mit dem STAT3-Inhibitor behandelt wurden. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse aus der „real-time“ PCR und geben Hinweise, dass die Bildung von IL-17C STAT3 abhängig ist.



### 3.2.2 hBD-3 und die Abhängigkeit von STAT3

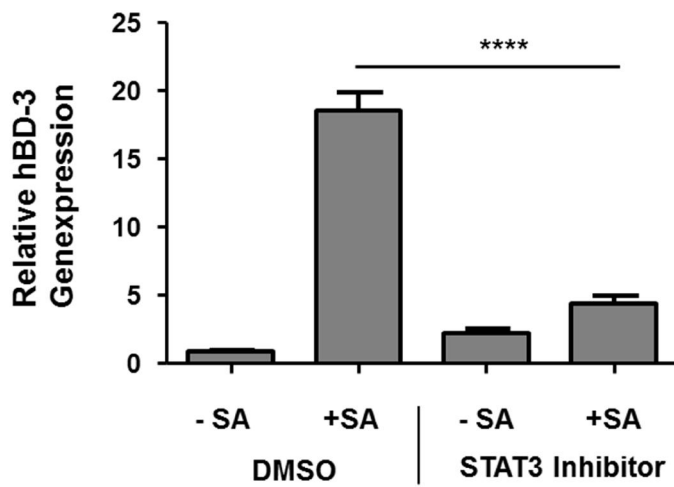
#### 3.2.2.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit der hBD-3 Genexpression von STAT3

hBD-3 ist ein wichtiges Abwehrmolekül und es kann *S. aureus* innerhalb weniger Minuten als Teil der konstitutiven Abwehr der Haut abtöten (Köten et al., 2012). Inwieweit eine STAT3-Defizienz zu einer geringeren Induktion von hBD-3 führt, sollte in den Experimenten analysiert werden. Dazu wurde zunächst die STAT3-siRNA genutzt (Abbildung 10).



**Abbildung 10. Die hBD-3 Genexpression ist abhängig von STAT3.** Zur Darstellung kommt ein exemplarischer Versuch mit der STAT3-siRNA von Qiagen. Die primäre Keratinozyten mit der Kontroll-siRNA und der STAT3-siRNA wurden über Nacht mit *S. aureus* inkubiert und die relative hBD-3 Genexpression nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels „real-time“ PCR gemessen (SA = *S. aureus*, \* $p < 0,05$  Student's t-Test).

Hierbei zeigte sich eine geringere Genexpression von hBD-3, wenn die Keratinozyten mit der STAT3-siRNA behandelt wurden. Zur Bestätigung wurde die STAT3-Abhängigkeit von hBD-3 zusätzlich mit dem STAT3-Inhibitor untersucht (Abbildung 11).

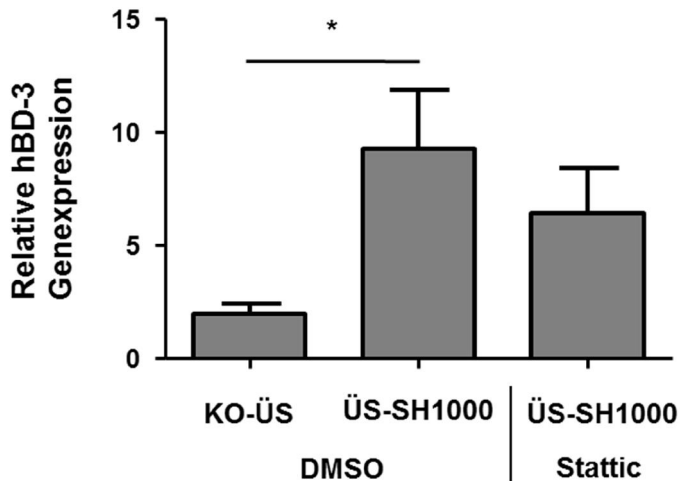


**Abbildung 11. Ergebnisse für hBD-3 mit dem STAT3-Inhibitor.** Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Nach einer dreistündigen Vorinkubation mit dem STAT3-Inhibitor bzw. DMSO wurden die Zellen über Nacht mit *S. aureus* inkubiert. Die Werte wurden nach RNA-Isolation und reverser Transkription durch die „real-time“ PCR ermittelt (SA = *S. aureus*, \*\*\*\* $p < 0,0001$  Student's t-Test).

Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von hBD-3 sowohl durch die STAT3-siRNA als auch durch den STAT3-Inhibitor *in vitro* herunterreguliert wurde und folglich in Keratinozyten die durch *S. aureus* vermittelte hBD-3 Induktion von einem funktionsfähigen STAT3-Molekül abhängig ist.

### 3.2.2.2 hBD-3 und die Abhängigkeit von STAT3 in den *ex vivo* Experimenten

Zur weiteren Untersuchung dieses Zusammenhanges wurden *ex vivo* Versuche durchgeführt. Dazu wurden Hautbiopsien mit dem STAT3-Inhibitor Stattic behandelt und mit einem Überstand von SH1000 stimuliert. In Abbildung 12 sind die Daten von drei unterschiedlichen Spendern aufgetragen.

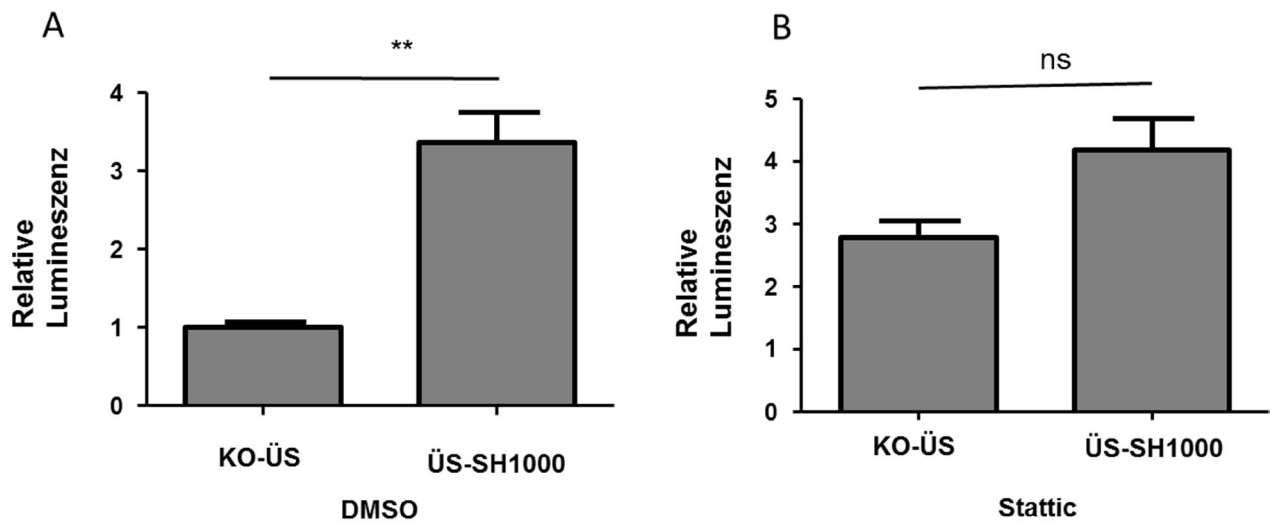


**Abbildung 12 hBD-3 untersucht *ex vivo*.** Hautbiopsien von drei unabhängigen Spendern wurden präpariert und Hautstückchen von circa 5 x 5 mm mit DMSO bzw. Stattic 1 : 5000 verdünnt in 1,5 ml Röhrchen für eine Stunde vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde zusätzlich zu DMSO bzw. Stattic 1 : 5000 verdünnt ein Überstand von SH1000 1 : 10 verdünnt zur Stimulation eingesetzt. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die relative IL-17C Genexpression mittels „real-time“ PCR ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (n = 15) basierend auf den drei Spendern (KO-ÜS=Kontroll-Überstand, ÜS-SH1000= Überstand von SH1000, \*p<0,05 Student's t-Test).

In den *ex vivo* Experimenten konnte eine signifikante Induktion der hBD-3 Genexpression bei der Stimulation gemessen werden. Diese Induktion konnte durch den STAT3-Inhibitor jedoch nur bei einem Spender signifikant herunterreguliert werden. Bei der Betrachtung der Daten aller drei Spender war durch hohe Schwankungen keine statistisch signifikante Aussage möglich.

### 3.2.2.3 Ergebnisse des Dualen Luziferasetest

Zur Untersuchung der Promotorregulation von hBD-3 wurden Versuche mit dem dualen Luziferasetest durchgeführt. Hierzu wurden primäre Keratinozyten mit einem Vektor transfiziert, der den hBD-3-Promotor mit nachgeschaltetem *Firefly*-Luziferase-Gen enthielt. Zusätzlich wurde ein *Renilla*-Luziferase-Vektor in die Zellen transfiziert. Die Transfektion der primären Keratinozyten erfolgte bei einer Konfluenz von circa 70 %. Die Stimulation der transfizierten Zellen mit einem Überstand von SH1000 und dem Kontrollüberstand erfolgte dann bei einer Zellkonfluenz von 100 %. STAT3 wurde dabei durch die Verwendung des STAT3-Inhibitors Stattic herunterreguliert.



**Abbildung 13 A+B STAT3-Abhängigkeit der Promotoraktivierung von hBD-3.** Primäre Keratinozyten wurden mit dem *Firefly*-Luziferase-Vektor mit einkloniertem hBD-3-Promotor und dem *Renilla*-Luziferase-Vektor transfiziert. Dabei wurde einerseits DMSO als Kontrolle 1 : 5000 eingesetzt und die Zellen mit dem Überstand von SH1000 bzw. mit dem Kontrollüberstand stimuliert (A). Andererseits wurde Stattic 1 : 5000 verdünnt zur Herunterregulierung von STAT3 genutzt und diese Zellen ebenfalls mit dem Überstand von SH1000 bzw. dem Kontrollüberstand stimuliert (B). Dargestellt ist die relative Lumineszenz bezogen auf die *Renilla*-Lumineszenzwerte eines exemplarischen Versuches (KO-ÜS = Kontroll-Überstand, ÜS-SH1000 = Überstand von SH1000, ns = nicht signifikant  $**p < 0,01$  Student's t-Test).

Die gemessenen Werte zeigen eine signifikante Aktivierung des hBD-3 Promotors bei der Stimulation der Zellen mit dem Überstand von SH1000 (Abbildung 13 A). Diese Aktivierung lässt sich durch die relative Zunahme der Lumineszenz im Sinne einer vermehrten Bildung der Firefly-Luziferase bezogen auf die Renilla-Luziferase-Lumineszenz erkennen. Bei Behandlung der Zellen mit dem STAT3-Inhibitor Stattic war die Zunahme der Lumineszenz im Gegensatz dazu nicht mehr signifikant (Abbildung 13 B). Dies gibt erste Hinweise auf eine STAT3-abhängige Aktivierung des hBD-3-Promotors bei der Stimulation bei *S. aureus*.

### 3.2.3 Untersuchungen zur STAT3-Abhängigkeit von RNase 7

Es ist bekannt, dass RNase 7 eine hohe Potenz hat *S. aureus* abzutöten (Simanski et al., 2010). Daher war es von Interesse, inwiefern RNase 7 von einem funktionsfähigen STAT3-Molekül abhängig ist, um die Anfälligkeit von HIES-Patienten für Hautinfektionen durch *S. aureus* besser zu verstehen.

Es wurde dieser Zusammenhang zunächst mit der STAT3-siRNA (Abbildung 14) und danach mit dem STAT3-Inhibitor untersucht (Abbildung 15).

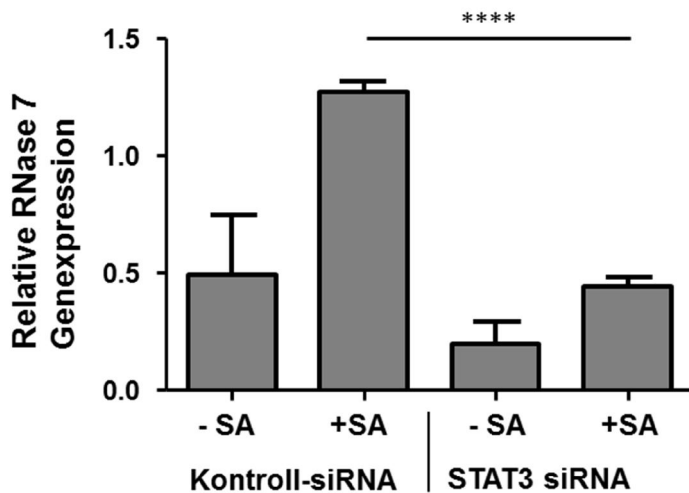


Abbildung 14. STAT3-Abhängigkeit von RNase 7. Dargestellt ist ein Versuch, bei dem mit der STAT3-siRNA von Qiagen gearbeitet wurde. Die transfizierten Keratinozyten wurden über Nacht mit *S. aureus* inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels „real-time“ PCR (SA = *S. aureus*, \*\*\*\* $p < 0,0001$  Student's t-Test).

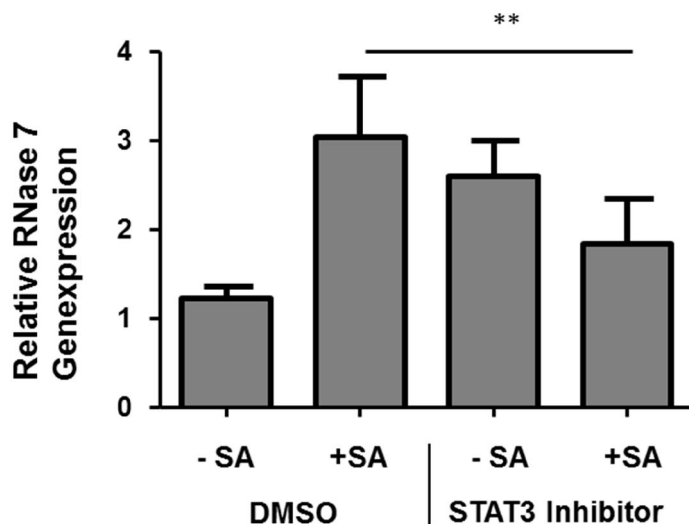
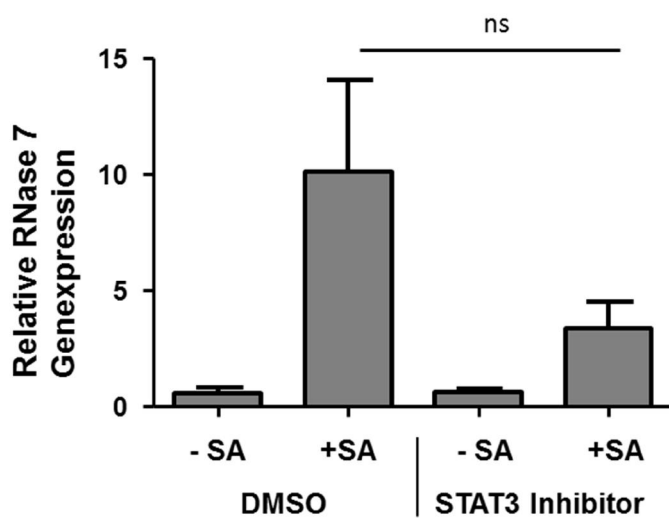


Abbildung 15. RNase 7 und die Stimulation mit *S. aureus* unter Anwesenheit des STAT3-Inhibitors. In der Abbildung sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen mit dem STAT3-Inhibitor zu sehen. Die Zellen wurden nach Vorinkubation mit dem STAT3-Inhibitor über Nacht mit *S. aureus* 1 : 20 verdünnt stimuliert. Die Werte ergeben sich aus „real-time“ PCR nach RNA-Isolation und reverser Transkription (SA = *S. aureus*, \*\* $p < 0,01$  Student's t-Test).

Die dargestellten Versuche liefern erste Hinweise für eine mögliche STAT3-Abhängigkeit von RNase 7. Dabei war zu beachten, dass beim Einsatz von *S. aureus* mit der optischen Dichte von 0,2 1 : 20 verdünnt die Genexpression von RNase 7 nur in geringem Maße anstieg.

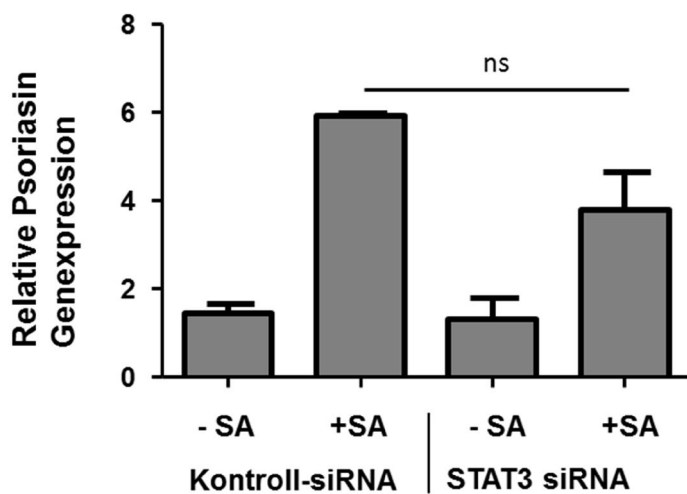
In einem weiteren Versuch, bei dem *S. aureus* in der Verdünnung 1 : 10 eingesetzt wurde, konnten höhere RNase 7 Induktionslevel erzielt werden. Dabei war zwar eine Herunterregulierung der RNase 7 Induktion durch den STAT3-Inhibitor sichtbar, aber es zeigte sich keine eindeutige statistische Signifikanz (Abbildung 16).



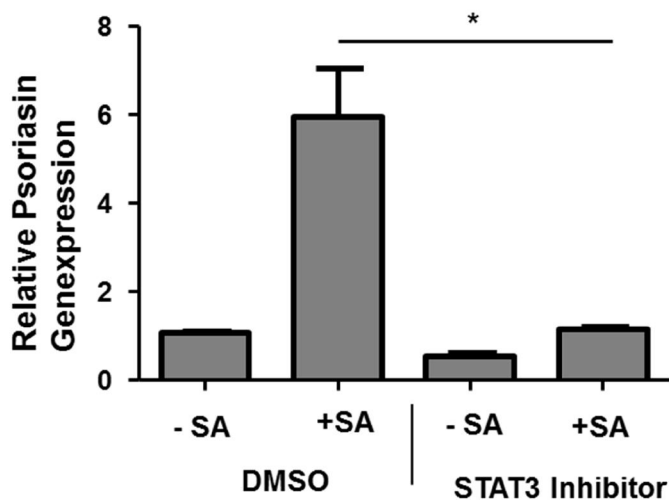
**Abbildung 16. RNase 7 Genexpression in Zusammenhang mit dem STAT3-Inhibitor.** Die Keratinozyten wurden drei Stunden vor Stimulationsstart mit dem STAT3-Inhibitor bzw. DMSO vorinkubiert. Die Stimulation wurde mit *S. aureus* über Nacht mit der optischen Dichte von 0,2 1 : 10 verdünnt durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach RNA-Isolation und reverser Transkription mittels „real-time“ PCR. Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch (SA = *S. aureus*, ns: nicht signifikant-> p= 0,1751 Student's t-Test).

### 3.2.4 Psoriasis im Zusammenhang mit *S.aureus* und die Abhängigkeit von STAT3

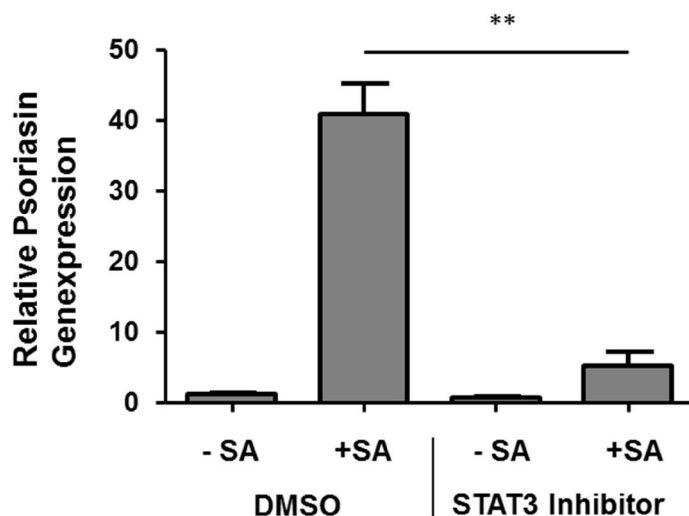
Psoriasis ist ein AMP, das in hoher Konzentration auf der Gesichts- und Kopfhaut zu finden ist. Dabei wurde gezeigt, dass Psoriasis vor allem gegen *E. coli* wirkt (Gläser et al., 2005). Inwieweit Psoriasis hingegen in der Abwehr von *S. aureus* eine Rolle spielt, ist noch wenig beschrieben. Es wurde Psoriasis im Zusammenhang mit der Stimulation von Keratinozyten mit *S. aureus* untersucht und in diesem Rahmen wurde auch die Abhängigkeit von STAT3 durch Einsatz der STAT3-siRNA und des STAT3-Inhibitors getestet (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19).



**Abbildung 17. Psoriasis und die Induktion durch *S. aureus* nach Transfektion der STAT3-siRNA.** Die Keratinozyten wurden über Nacht mit *S. aureus* mit der optischen Dichte von 0,2 1 : 20 verdünnt stimuliert. Dabei wurde der Einfluss der STAT3-siRNA auf die Stimulation untersucht. Die Genexpression wurde nach RNA-Isolation, reverser Transkription und „real-time“ PCR gemessen (SA = *S. aureus*, ns: nicht signifikant ->  $p = 0,0665$  Student's t-Test).



**Abbildung 18. Psoriasis und die Stimulation mit *S. aureus* in Anwesenheit des STAT3-Inhibitors.** Zur Darstellung kommt ein Experiment, bei dem die Keratinozyten mit *S. aureus* mit der optischen Dichte von 0,2 1 : 20 verdünnt stimuliert wurden in Anwesenheit von DMSO bzw. vom STAT3-Inhibitor. Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die relative Psoriasis-Genexpression mittels „real-time“ PCR gemessen (SA = *S. aureus*, \* $p < 0,05$  Student's t-Test).



**Abbildung 19. Psoriasis und die Abhängigkeit von STAT3.** Die Keratinozyten wurden mit einer höheren Anfangskonzentration von *S. aureus* stimuliert (optische Dichte von 0,2 nicht 1 : 20 sondern 1:10 verdünnt). Es konnte durch die RNA-Isolation, reverse Transkription und „real-time“ PCR eine Induktion der Psoriasis-Genexpression gemessen werden und eine signifikant geringere Genexpression in Anwesenheit des STAT3-Inhibitors festgestellt werden (SA = *S. aureus*, \*\* $p < 0,01$  Student's t-Test).

Die Versuche zeigten, dass Psoriasis von *S. aureus* induziert wurde und dabei eine Abhängigkeit von STAT3 besteht. Es war auffällig, dass Psoriasis besonders stark exprimiert wurde, wenn die Anfangskonzentration der Bakterien höher gewählt wurde (Abbildung 19).



## 4 Diskussion

### 4.1 STAT3 und seine Bedeutung in der kutanen Abwehr

#### 4.1.1 Molekulares Verständnis des HIES

Das HIES ist eine Erkrankung, deren molekulares Verständnis eine wichtige Rolle für die weitere Erforschung von Zusammenhängen in der Immunabwehr der menschlichen Haut spielt. Dieses komplexe System kann oft erst dann besser verstanden werden, wenn zum Beispiel durch eine genetische Erkrankung Infektionen entstehen, die unter normalen Umständen durch das kompetente Immunsystem abgewehrt werden können.

Beim HIES wurde zunächst herausgefunden, dass nach einer Stimulation mit IL-6 die Leukozyten der Patienten weniger nachgeordnete Zytokine sezernieren (Holland et al., 2007). Dabei ist schon lange bekannt, dass STAT3 eine große Rolle in der Signalvermittlung von IL-6 spielt (Zhong et al., 1994). Durch diesen Zusammenhang wurde STAT3 als Krankheitsgen in die Überlegungen miteinbezogen und schließlich als solches identifiziert (Holland et al., 2007). IL-6 ist wichtig für die Regulation des Immunsystems und die Aktivierung einer akuten Entzündungsreaktion (Heinrich et al., 2003). Das Fehlen eines funktionstüchtigen STAT3-Moleküls kann somit einen Teil der Immunschwäche von HIES-Patienten im Sinne einer herabgesetzten Antwort auf IL-6 erklären (Mogensen, 2013).

Zusätzlich wurde beschrieben, dass bei den HIES-Patienten die Differenzierung von T-Helferzellen in die  $T_{H17}$ -Zellreihe herabgesetzt ist (Milner et al., 2008). Die Entwicklung von  $T_{H17}$ -Zellen ist auf ein funktionsfähiges STAT3 Molekül angewiesen (Yang et al., 2007). Dies könnte eine Erklärung für die dominante Rolle der Haut- und Lungeninfektionen sein, obwohl alle Zellen der HIES-Patienten von der STAT3 Mutation betroffen sind. Aufgrund der herabgesetzten Bildung von  $T_{H17}$ -Zellen werden Haut- und Lungenepithelzellen durch die Zytokine dieser Zellen weniger stimuliert. Es wurde aber beschrieben, dass gerade diese Zelltypen stark auf die Zytokine von  $T_{H17}$ -Zellen angewiesen sind und somit die gestörte Immunabwehr in diesen Geweben durch das Fehlen von  $T_{H17}$ -Zellen erklärt werden kann (Minegishi et al., 2009).

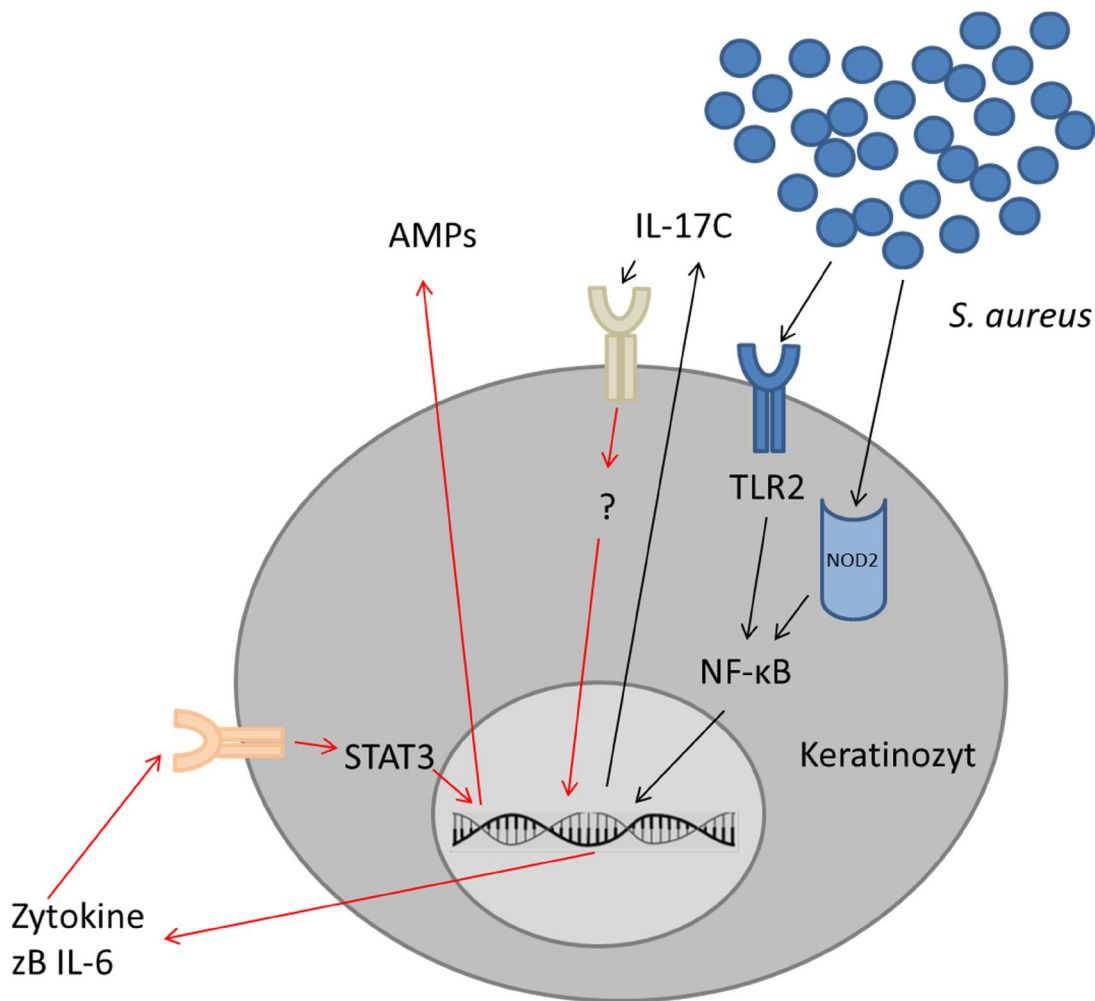
Zwar bietet der zuletzt genannte Punkt eine Erklärung der auffälligen Hautinfektionen, jedoch bleibt die Frage offen, ob auch die Keratinozyten selbst von der STAT3 Mutation in ihrem eigenen angeborenen Abwehrsystem gestört sind.

#### 4.1.2 Steuerung der kutanen Abwehr und Rolle von IL-17C

HIES-Patienten leiden vor allem unter Hautinfektionen durch *S. aureus*, die sich als kalte Hautabszesse präsentieren (Davis et al., 1966). *S. aureus* ist ein Bakterium, das durch Keratinozyten mithilfe spezialisierter Rezeptoren, zum Beispiel TLR2 (Miller, 2008) oder NOD2 (Roth et al., 2014), erkannt werden kann. Dabei ist beschrieben worden, dass die Aktivierung von NOD2 durch *S. aureus* zu einer Induktion von IL-17C führt (Roth et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine durch *S. aureus* induzierte sehr schnelle Zunahme der Genexpression von IL-17C, die durch eine Hemmung von STAT3 eingeschränkt wird. Dieser Zusammenhang konnte sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* gezeigt werden (Abbildung 5 - Abbildung 8). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Bildung IL-17C bei einer STAT3-Hemmung vermindert wird (Abbildung 9). Dies legt eine verminderte Wirkung von IL-17C beim HIES nahe, so dass die normale, durch IL-17C aktivierte und gesteuerte Immunreaktion der Keratinozyten gestört sein könnte (Pappu et al., 2012).

Inwieweit IL-17C AMPs induziert, ist noch nicht hinreichend erforscht. Es wurde beschrieben, dass der IL-17C Rezeptor vor allem auf Epithelzellen wie Keratinozyten exprimiert wird (Ramirez-Carrozzi et al., 2011), wodurch die Rolle von IL-17C zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems von Epithelzellen unterstrichen wird. IL-17C wirkt dementsprechend autokrin auf Keratinozyten und es konnte die nachfolgende Induktion von hBD-2 (ein weiteres beta Defensin) und Psoriasin gezeigt werden (Ramirez-Carrozzi et al., 2011). Eine Bildung von hBD-3 durch IL-17C, welche aufgrund der Wirksamkeit gegen *S. aureus* sinnvoll wäre, wurde noch nicht untersucht. Ein Einfluss von IL-17C auf RNase 7 konnte weder alleine noch in Kombination mit anderen Zytokinen gezeigt werden (Simanski et al., 2013). Die Induktion von Psoriasin und hBD2 durch die Stimulation mit IL-17C war erst nach längerer Stimulation (24 – 48h) zu messen (Ramirez-Carrozzi et al., 2011), was auf unbekannte Zwischenmechanismen hindeuten könnte.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente zeigen, dass die Genexpression der AMPs im Gegensatz zu IL-17C erst nach einer längeren Stimulationsdauer mit *S. aureus* erfolgt. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass eine mögliche Induktion von AMPs durch IL-17C nicht direkt erfolgt, sondern ein oder mehrere Zwischenschritte benötigt werden. Zusätzlich könnten auch andere von IL-17C unabhängige Mechanismen, die durch *S. aureus* aktiviert werden und über mehrere Schritte ablaufen, die spätere Hochregulierung von AMPs erklären. Abbildung 20 zeigt graphisch mögliche Abläufe nach der Stimulierung mit *S. aureus*.



**Abbildung 20. Wirkung von *S. aureus* auf Keratinozyten.** Dargestellt sind mögliche Signaltransduktionswege nach der Stimulation von Keratinozyten mit *S. aureus*. *S. aureus* wird durch TLR2 oder NOD2 erkannt. Das Signal wird daraufhin z.B. über NF-κB (Miller, 2009; Lecat et al., 2010) an den Zellkern weitergeleitet. Dadurch werden verschiedene Zytokine und auch IL-17C ausgeschüttet. IL-17C wirkt autokrin auf die Keratinozyten, wobei die genauen nachgeschalteten Mechanismen noch nicht bekannt sind. Im Endeffekt werden durch Zytokinsignale AMPs ausgeschüttet. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass STAT3 ein Transkriptionsfaktor sein könnte, der die Induktion von AMPs in Keratinozyten vermittelt.

### 4.1.3 Die Rolle von RNase 7 und hBD-3 in der Abwehr von *S. aureus* beim HIES

#### 4.1.3.1 RNase 7

In der Abwehr von *S. aureus* ist RNase 7 ein wichtiger Effektorstoff mit hoher Aktivität gegen diesen Keim (Kisich et al., 2007; Simanski et al., 2010). Generell ist RNase 7 ein AMP mit einer breiten antimikrobiellen Aktivität (Harder and Schröder, 2002). Dabei wurde beschrieben, dass geringe Expressionslevel von RNase 7 mit einer erhöhten Gefahr für Infektionen mit *S. aureus* einhergehen (Zanger et al., 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine statistisch signifikante geringere Induktion von RNase 7 bei der Herunterregulierung von STAT3, jedoch können diese Daten aufgrund der geringen Induktionsstärke von RNase 7 nur erste Hinweise für eine etwaige Abhängigkeit geben (Abbildung 14, Abbildung 15).

Ein Versuch mit dem STAT3-Inhibitor, bei dem *S. aureus* in etwas höherer Ausgangskonzentration (optische Dichte von 0,2 1 : 10 und nicht 1 : 20 verdünnt) über Nacht eingesetzt wurde, erbrachte bessere Induktionslevel der RNase 7 mRNA-Konzentration. Hierbei war jedoch durch leicht schwankende Werte keine statistisch signifikante Aussage zu treffen, obwohl die Ergebnisse im biologischen Sinne auf eine STAT3-Abhängigkeit von RNase 7 hindeuten (Abbildung 16).

RNase 7 wird neben der konstitutiven Expression auch durch unterschiedliche Stimuli verstärkt ausgeschüttet. Dabei wurde beschrieben, dass vor allem die synergistische Wirkung von IL-17A und IFN- $\gamma$  eine gesteigerte Expression von RNase 7 bedingt, welche durch eine Hemmung von STAT3 aufgehoben wird (Simanski et al., 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, dass RNase 7 durch die Stimulation mit *S. aureus* in Keratinozyten induziert wird und es zeigen sich Hinweise für eine Abhängigkeit von STAT3. Dabei bleibt noch offen, ob die Induktion von RNase 7 in der Haut nach Stimulation mit *S. aureus* durch IL-17A und IFN- $\gamma$  erfolgt oder eher ein anderer Signalweg aktiviert wird, bei dem auch eine STAT3-abhängige Induktion von RNase 7 stattfindet.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass ein Faktor für die hohe Anfälligkeit von HIES-Patienten für Infektionen mit *S. aureus* die STAT3-abhängige geringere Induktion von RNase 7 ist.

#### **4.1.3.2 hBD-3**

hBD-3 ist ebenfalls ein Peptid mit hoher antimikrobieller Aktivität (Harder et al., 2001). Dabei wurde beschrieben, dass hBD-3 ein sehr wichtiges AMP zur Abwehr von *S. aureus* ist (Kisich et al., 2007).

In den Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hBD-3-Genexpression durch die Stimulation mit *S. aureus* sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* induziert wird. Dabei war in der Zellkultur sowohl mit der STAT3-siRNA als auch mit dem STAT3-Inhibitor eine signifikante verminderte Genexpression von hBD-3 zu detektieren (Abbildung 10, Abbildung 11). In den *ex vivo*-Versuchen war diese Herunterregulierung nicht eindeutig zu bestätigen (Abbildung 12). Dies lässt am ehesten auf physiologische interindividuelle Unterschiede in der Steuerung der Immunabwehr erklären und müsste durch eine Erhöhung der Versuchszahl weiter untersucht werden.

Für hBD-3 wurde beschrieben, dass TLR2 eine entscheidende Rolle für die Induktion spielt (Menzies and Kenoyer, 2006). Zusätzlich wurde herausgefunden, dass STAT3 bei der Stimulation von Keratinozyten mit Histamin aktiviert wird und nachfolgend hBD-3 gebildet wird (Ishikawa et al., 2009). Die Ergebnisse

dieser Arbeit unterstreichen eine STAT3 abhängige Induktion von hBD-3 bei der Stimulation mit *S. aureus*. Dabei ist es vorstellbar, dass die Aktivierung von STAT3 über den TLR 2 stattfindet, welcher bekanntermaßen durch *S. aureus* aktiviert wird (Miller, 2008). Die Ergebnisse des dualen Luziferasetestes bieten ersten Hinweise, dass STAT3 den hBD-3 Promotor aktiviert (Abbildung 13). Jedoch spielen dabei womöglich noch Zwischenschritte über Zytokine eine Rolle, die die späte Erhöhung der Genexpression von hBD-3 erklären.

Die geringere Induktion von hBD-3 durch den STAT3-Defekt ist eine mögliche zusätzliche Erklärung für die Hautinfektionen mit *S. aureus* bei HIES-Patienten.

#### **4.1.4 Wirkung von Psoriasin bei der Infektion mit *S. aureus***

Psoriasin ist ein AMP, das vor allem gegen *E. coli* wirkt. Dabei konnte eine Wirkung auf *S. aureus* nur in hohen Konzentrationen gezeigt werden (Gläser et al., 2005). Bei den Stimulationsversuchen aus dieser Arbeit wurde eine vermehrte Induktion von Psoriasin durch die Stimulation mit *S. aureus* festgestellt, die durch die Herunterregulierung von STAT3 gehemmt werden konnte (Abbildung 18, Abbildung 19). Diese Induktion von Psoriasin bei der Stimulation legt eine Wirkung gegen *S. aureus* nahe. Dabei ist es denkbar, dass Psoriasin keine direkte Aktivität gegen *S. aureus* hat, sondern auf andere Weise eine Bekämpfung dieses Keimes ermöglicht.

Eine Hypothese wäre, dass Psoriasin einen synergistischen Effekt mit anderen AMPs aufweist. Ein beschriebener Mechanismus zur Wirkung von AMPs ist die Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran der Bakterien (Oren and Shai, 1998; Wiesner and Vilcinskas, 2010). Für Psoriasin ist jedoch dargelegt worden, dass ein Zinkentzug aus den Bakterien die antimikrobielle Wirkung darstellen könnte (Gläser et al., 2005). Es ist vorstellbar, dass Psoriasin die Wirkung von anderen AMPs durch den Zinkentzug verstärkt und so indirekt das Abtöten von *S. aureus* unterstützt.

Zusätzlich ist diskutiert worden, dass Psoriasin eine chemotaktische Wirkung haben könnte (Wolf et al., 2009) und eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zur Bildung von Zytokinen durch Psoriasin stattfindet (Zheng et al., 2008). Dies ist ein weiterer Mechanismus, der die Rolle von Psoriasin in der körpereigenen Abwehr gegen *S. aureus* erklären könnte.

In den Experimenten dieser Arbeit war auffällig, dass Psoriasin vor allem dann bei der Stimulation mit *S. aureus* gebildet wurde, als der Keim in einer höheren Anfangskonzentration (optische Dichte von 0,2 1 : 10 und nicht 1 : 20 verdünnt) eingesetzt wurde. Diese Beobachtung unterstreicht die mutmaßliche unterstützende Funktion von Psoriasin in der Bekämpfung von *S. aureus*. Die Keratinozyten scheinen

Psoriasin vor allem dann zu bilden, wenn die herkömmlichen Mechanismen gegen *S. aureus* nicht ausreichen.

#### **4.1.5 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass STAT3 eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Keratinozyten spielt. Insbesondere wurde aufgedeckt, dass das Zytokin IL-17C und die AMPs hBD-3, RNase 7 und Psoriasin auf ein funktionsfähiges STAT3-Molekül angewiesen sind, um bei der Infektion mit *S. aureus* ausreichend induziert werden zu können.

Welche genauen molekularen Mechanismen der Induktion von AMPs bei der Stimulation mit *S. aureus* zugrunde liegen und durch welche Zytokine dabei die Aktivierung von STAT3 bedingt ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen aber, dass STAT3 für die *S. aureus*-induzierte Genexpression von Psoriasin, hBD-3 und RNase 7 in Keratinozyten essentiell ist. Ob jedoch STAT3 direkt die Transkription der AMPs induziert oder nur vorgeschaltete Zytokine, bleibt noch zu untersuchen.

Die Daten dieser Arbeit führen zur Hypothese, dass das Abwehrsystem der Keratinozyten beim HIES durch eine geringere Genexpression von IL-17C, Psoriasin, hBD-3 und RNase 7 aufgrund des HIES-assoziierten STAT3-Defekts gestört ist. Dies könnte eine weitere Erklärung für die dominanten Hautinfektionen mit *S. aureus* bei HIES liefern.

In der Zukunft sollten diese Ergebnisse *in vivo* bestätigt werden, um sicherzustellen, dass die Zusammenhänge auf die HIES-Patienten übertragbar sind. Hierzu muss zum Beispiel getestet werden, ob die Patienten tatsächlich weniger AMPs auf die Hautoberfläche freisetzen.

## 4.2 Aspekte für die HIES-Therapie und Ausblick

HIES-Patienten leiden unter einer ekzematösen Dermatitis, die durch Infektionen mit *S. aureus* unterstützt wird (Yong et al., 2012). Daher haben sich Antibiotika und topische antiinfektiöse Maßnahmen auf der Haut als Therapeutika bewährt (Grimbacher et al., 2005). Die antibiotische Therapie wird dabei auch prophylaktisch durchgeführt. Problematisch bei der Therapiesteuerung sind die oftmals nur geringen Entzündungszeichen, die ein Aufflammen von Infektionen nur schwer detektierbar machen. Teilweise bleibt zur Therapie der „kalten Abszesse“ nur die chirurgische Exzision (Yong et al., 2012).

Ein neuer Durchbruch gelang im Jahre 2014, als bei einer 14-jährigen HIES-Patientin eine Stammzelltransplantation erfolgreich durchgeführt werden konnte (Patel et al., 2015). Davor waren die seltenen Versuche einer Stammzelltransplantation kaum erfolgreich. Die Möglichkeit dieser Therapie lässt auf eine Heilung der Erkrankung hoffen.

Nichtsdestotrotz hat die antibiotische, supportive Therapie weiterhin ihren Stellenwert. Dabei besteht jedoch immer die Gefahr von Resistenzentwicklungen seitens der Bakterien. Zusätzlich werden die Patienten den Nebenwirkungen der Antibiotikatherapie ausgesetzt, welche gerade bei langer prophylaktischer Einnahme ein großes Problem darstellen.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit, welche vermuten lassen, dass AMPs bei HIES-Patienten durch die STAT3-Mutation weniger gebildet werden, drängt sich die Idee auf, hieraus einen therapeutischen Nutzen zu ziehen. Die therapeutische Anwendung von AMPs ist in den letzten Jahren in der Forschung zusehends in den Vordergrund gerückt, da aufgrund von immer mehr multiresistenten Erregern dringend neue Therapieoptionen gefunden werden müssen.

Doch die therapeutische Anwendung von AMPs ist noch am Anfang ihrer Entwicklung. Neben den Herausforderungen der eigentlichen Herstellung und den Problemen, eine stabile Darreichungsform zu finden (da Costa et al., 2015), bleibt die Frage zu klären, ob der großflächige, künstliche Einsatz von AMPs das vernetzte und schon lange bestehende Immunsystem der Haut bzw. des ganzen Körpers in ein Ungleichgewicht bringen könnte. Es wird beschrieben, dass Resistenzentwicklungen gegen AMPs selten zu beobachten sind, da diese vor allem die Bakterienmembran angreifen und die Bakterien diesen Angriffspunkt nur schwer verändern können, ohne die strukturelle und funktionelle Integrität der Zelle zu gefährden (Lai und Gallo, 2009). Trotzdem wird die Entstehung von natürlichen Resistenzen in der evolutionären Co-Entwicklung von AMPs und Bakterien genannt (Peschel und Sahl, 2006; Peters et al., 2010). Im Gegensatz zu herkömmlichen Antibiotika sind AMPs in der Lage, nicht nur eine bestimmte Zielstruktur, sondern mehrere überlebenswichtige Strukturen der Bakterien anzugreifen (Peschel und

Sahl, 2006). Zusätzlich ist die induzierte Sekretion von mehreren AMPs gleichzeitig und die dabei beobachteten sehr hohen Konzentrationen von AMPs am Ort der Infektion eine kaum zu überwindende Barriere für eindringende Bakterien (Lai und Gallo, 2009), sodass aktuell die seltenen Resistenzen kaum eine biologische Relevanz besitzen.

Um tatsächlich AMPs für HIES-Patienten als Therapeutikum in Betracht zu ziehen bleibt zu beachten, dass unsere Experimente nur erste Hinweise für die tatsächliche STAT3-Abhängigkeit der AMP-Sekretion von HIES-Patienten *in vivo* geben. Zusätzlich wurde eine Diskrepanz der antimikrobiellen Aktivität von AMPs zwischen *in vitro* Experimenten und der tatsächlichen Wirkung *in vivo* beschrieben, da diese vom physiologischen Milieu abhängig ist und z.B. durch verschiedene Salzkonzentrationen unterschiedlich ausgeprägt ist (Dorschner et al., 2006; Mahlapuu et al., 2016). Darüber hinaus haben die AMPs neben der direkten Aktivität gegen Bakterien eine nicht zu vernachlässigende, wichtige Aufgabe in der Regulierung und Aktivierung von anderen Immunzellen, um eine komplexe Immunantwort zu formen (Hancock and Diamond, 2000). Ob diese immunomodulatorischen Eigenschaften der AMPs sich für die Behandlung von HIES-Patienten positiv auswirken würden, bleibt zu klären.

Zusammenfassend bleibt der Einsatz von AMPs als Therapeutika ein spannendes Feld der Zukunft, welches die immer größer werdenden Probleme in der Bekämpfung von Infektionen teilweise lösen könnte. Einige solcher Therapeutika sind schon in der klinischen Phase der Entwicklung (Mahlapuu et al., 2016) und es bleibt abzuwarten, ob Nutzen oder Risiken im Endeffekt überwiegen.



## 4.3 Arbeit mit biologischen Materialien

### 4.3.1 Zellkultur

Obwohl die Stimulationsbedingungen bei jedem Experiment soweit wie möglich gleich gestaltet wurden, ließen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen in der Höhe der Induktion hinsichtlich eines Genes beobachten. Der Faktor, der bei unterschiedlichen Versuchen am variabelsten ist, sind die Keratinozyten. Trotz Benutzung der gleichen Zellcharge wird die Aktivität und Konfluenz in den verschiedenen Versuchen nur näherungsweise gleich gewesen sein. Vor allem der Rezeptorbesatz der Zellen bestimmt die Reaktion auf die Bakterien. Dabei wurde schon beschrieben, dass mit steigender Differenzierung der Keratinozyten die Dichte an TLRs zunimmt (Pivarcsi et al., 2004). Es könnte sein, dass trotz optisch gleicher Konfluenz und zeitlich gleicher Wachstumsdauer die Ausbildung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche in manchen Versuchen noch nicht abgeschlossen war und durch eine geringe Anzahl von Rezeptoren die unterschiedliche Höhe der Induktionen erklärbar ist.

Zusätzlich ist der *S. aureus* als zweite biologische Komponente, trotz gleicher Kultivierungsbedingungen und Verdünnungsschritte, eine Quelle der Variabilität. Es konnten zwar reproduzierbare Induktionen beobachtet werden, dennoch gab es auch Versuche, bei denen der Keim die Keratinozyten nicht in gleicher Weise stimulierte. Mutmaßlich lag dies an minimalsten Variationen in der Kultivierung der Bakterien und damit einhergehenden Unterschieden in der Ausbildung von Virulenzfaktoren, so dass die Keratinozyten unterschiedlich stark zur Induktion von Abwehrstoffen angeregt wurden.

Die oben genannten Punkte können Erklärungen liefern, weshalb vor allem bei RNase 7 die Induktion trotz ausführlicher Suche nach den optimalen Stimulationsbedingungen oft nicht reproduzierbar gelang.

### 4.3.2 *Ex vivo* Versuche

Für die durchgeführten *ex vivo* Versuche wurden Hautbiopsien von drei unterschiedlichen Spendern verwendet. Dabei war weder Alter noch Geschlecht bekannt. Die durchgeführte Aufbereitung und Stimulation wurde soweit wie möglich standardisiert durchgeführt, jedoch ergaben sich nichtsdestotrotz Unterschiede in der Induktionsstärke von hBD-3 und IL-17C und auch in der Inhibition durch den STAT3-Inhibitor. Eine mögliche Erklärung ist der spenderabhängige Hautzustand und interindividuelle Unterschiede in der Immunantwort. Es ist leicht vorstellbar, dass durch die Stimulation der Haut bei einem Spender STAT3 aktiviert wird und somit auch eine Inhibition darstellbare Effekte erzielt. Bei einem anderen Spender könnte jedoch vermehrt ein anderer Signalweg angesprochen werden und daher weder eine STAT3-Aktivierung noch dessen Inhibition detektierbar sein. Die hier aufgeführten Versuche

bieten erste Hinweise für die tatsächlichen Zusammenhänge *in vivo*. Eine Erhöhung der Experimentanzahl ist in der Zukunft dringend notwendig, um die Signalwege der in menschlicher Haut besser verstehen zu können.

### **4.3.3 Statistische Auswertung**

Im Zusammenhang mit dem oben aufgeführten Punkten bleibt die statistische Auswertbarkeit von biologischen Experimenten zu diskutieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde oft beobachtet, dass bei den kleinen Stichproben die statistische Signifikanz durch Schwankungen in den Mehrfachwerten nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl im biologischen Sinne durch die Werte ein offensichtlicher Zusammenhang gezeigt wurde. Daher werden in dieser Arbeit auch zum Teil Grafiken gezeigt, bei denen der P-Wert knapp über dem allgemein geforderten Signifikanzniveau von 0,05 liegt.

Alles in allem bleibt zu erwähnen, dass die Zellkultur eine Annäherung an die Wirklichkeit ist und die Ergebnisse erste Hinweise auf die tatsächlichen Mechanismen geben.

## 5 Zusammenfassung

Die Haut ist permanent einer Vielzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Die Epithelzellen der Haut, die Keratinozyten, sind in der Lage Mikroorganismen zu erkennen und nachfolgend eine Verteidigungsreaktion durch die Expression von Abwehrmolekülen (insbesondere antimikrobielle Peptide und Zytokine) zu initiieren. Über die beteiligten Signaltransduktionswege, die zur mikroorganismeninduzierten Expression von Abwehrmolekülen führen, ist noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, in wieweit das Signaltransduktionsmolekül STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“) die Expression von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) und Zytokinen nach Stimulation von Keratinozyten mit Bakterien (*Staphylococcus aureus*) vermittelt.

Eine Dysregulation des STAT3-Signalweges und eine daraus resultierende defekte epidermale Abwehr könnte zu einer erhöhten Infektanfälligkeit beitragen, so wie es in Patienten mit Mutationen im STAT3-Gen beschrieben wurde. Diese Patienten leiden unter dem so genannten Hyper-IgE-Syndrom (HIES) und haben neben Lungeninfektionen auch Infektionen der Haut, vor allem mit *Staphylococcus aureus*.

In dieser Arbeit wurde genauer untersucht, inwieweit die STAT3 Mutation die Abwehrstrategien von Keratinozyten betrifft, um so die gestörte Abwehr der HIES-Patienten besser zu verstehen. Dazu wurde STAT3 mittels einer STAT3-siRNA und einem STAT3-Inhibitor in Keratinozyten und in Hautbiopsien herunterreguliert und die AMP- und Zytokinexpressionslevel mittels „real-time“-PCR analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass mehrere AMPs (Psoriasin, hBD-3 und RNase 7) und IL-17C als wichtiges epidermales Zytokin durch die Stimulation mit *Staphylococcus aureus* induziert werden. Diese Induktion konnte durch die STAT3-Hemmung signifikant gemindert werden.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die genannten Abwehrstoffe auch bei den HIES-Patienten weniger gebildet werden könnten. Dementsprechend liefert die hier vorliegende Arbeit Hinweise für eine Dysregulation des epidermalen Abwehrsystems bei diesen Patienten und trägt zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen STAT3-Mutation und erhöhter kutaner Infektanfälligkeit bei.

## 6 Literaturverzeichnis

- Bär, M., Bär, D., Lehmann, B., 2009. Selection and validation of candidate housekeeping genes for studies of human keratinocytes--review and recommendations. *J. Invest. Dermatol.* 129, 535–537.
- Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., Roitt, I., 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 21, 12–23.
- Boman, H.G., 1995. Peptide Antibiotics and Their. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92.
- da Costa, J.P., Cova, M., Ferreira, R., Vitorino, R., 2015. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2023–2040.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421.
- Davis, S.D., Schaller, J., Wedgwood, R.J., 1966. Recurrent , “ Cold ”, Staphylococcal Abscesses leprosy : The patient. *Lancet* 1013–1015.
- Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J., White, B. a, 1996. Polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 58, 275–292.
- Dorschner, R.A., Lopez-Garcia, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V., Gallo, R.L., 2006. The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* 20, 35–42.
- Erlewyn-Lajeunesse, M.D., 2000. Hyperimmunoglobulin-E syndrome with recurrent infection: a review of current opinion and treatment. *Pediatr. Allergy Immunol.* 11, 133–141.
- Farr, A., Roman, A., 1992. A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucleic Acids Res.* 20, 920. doi:10.1093/nar/20.4.920
- Gallo, J.J.B. and R.L., 2011. Protecting the boundary: the sentinel role of host defense peptides in the skin Jamie. *Changes* 68, 2189–2199.
- Gallo, R.C., 1971. Reverse Transcriptase, the DNA Polymerase of Oncogenic RNA Viruses. *Nature* 234, 194–198.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.-M., 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6, 57–64.
- Goding, J.W., 1978. Use Of Staphylococcal Protein A as an Immunological Reagent. *J. Immunol. Methods* 20, 241–253.
- Grimbacher, B., Holland, S.M., Gallin, J.I., Greenberg, F., Hill, S.C., Malech, H.L., Miller, J.A., O'Connell, A.C., Puck, J.M., 1999a. Hyper-IgE Syndrome with Recurrent Infections - an autosomal dominant

- multisystem Disorder. *N. Engl. J. Med.* 340, 692–700.
- Grimbacher, B., Holland, S.M., Puck, J.M., 2005. Hyper-IgE syndromes. *Immunol. Rev.* 203, 244–250.
- Grimbacher, B., Schäffer, A.A., Holland, S.M., Davis, J., Gallin, J.I., Malech, H.L., Atkinson, T.P., Belohradsky, B.H., Buckley, R.H., Cossu, F., Español, T., Garty, B.-Z., Matamoros, N., Myers, L.A., Nelson, R.P., Ochs, H.D., Renner, E.D., Wellinghausen, N., Puck, J.M., 1999b. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 735–744.
- Hancock, R.E., Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8, 402–410.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M., 2001. Isolation and Characterization of Human  $\beta$ -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707–5713.
- Harder, J., Schröder, J.-M., Gläser, R., 2012. The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. *Exp. Dermatol.* 22, 1–5.
- Harder, J., Schröder, J.M., 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277, 46779–46784.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–32.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., Schaper, F., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
- Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Kanno, Y., O’Shea, J.J., 2010. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 425–34.
- Holland, S.M., DeLeo, F.R., Elloumi, H.Z., Hsu, A.P., Uzel, G., Brodsky, N., Freeman, A.F., Demidowich, A., Davis, J., Turner, M.L., Anderson, V.L., Darnell, D.N., Welch, P.A., Kuhns, D.B., Frucht, D.M., Malech, H.L., Gallin, J.I., Kobayashi, S.D., Whitney, A.R., Voyich, J.M., Musser, J.M., Woellner, C., Schäffer, A.A., Puck, J.M., Grimbacher, B., 2007. STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 357, 1608–1619.
- Ihle, J.N., Kerr, I.M., 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11, 69–74.
- Imada, K., Leonard, W.J., 2000. The Jak-STAT pathway. *Mol. Immunol.* 37, 1–11.
- Ishikawa, T., Kanda, N., Hau, C.S., Tada, Y., Watanabe, S., 2009. Histamine induces human  $\beta$ -defensin-3 production in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 56, 121–127.

- Kisich, K.O., Howell, M.D., Boguniewicz, M., Heizer, H.R., Watson, N.U., Leung, D.Y.M., 2007. The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2368–2380.
- Köten, B., Becker, K., Podschun, R., Von Eiff, C., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Gläser, R., 2012. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* bacteremia strains to different skin-derived antimicrobial proteins. *Arch. Dermatol. Res.* 304, 633–637.
- Krishna, S., Miller, L.S., 2012. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin. Immunopathol.* 34, 261–280.
- Lai, Y., Gallo, R.L., 2009. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30, 131–141.
- Lecat, A., Piette, J., Legrand-Poels, S., 2010. The protein Nod2: An innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem. Pharmacol.* 80, 2021–2031.
- Li, H., Chen, J., Huang, A., Stinson, J., Heldens, S., Foster, J., Dowd, P., Gurney, A.L., Wood, W.I., 2000. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 773–8.
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L.A., 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203, 2271–9.
- Ma, C.S., Chew, G.Y.J., Simpson, N., Priyadarshi, A., Wong, M., Grimbacher, B., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Cook, M.C., 2008. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.* 205, 1551–7.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C., 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 194.
- McCaig, L.F., McDonald, L.C., Mandal, S., Daniel, B.J., 2006. *Staphylococcus aureus*--associated Skin and Soft Tissue Infections in Ambulatory Care. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1715–1723.
- Medzhitov, R., Janeway, C. a, 1997. Innate immunity : impact on the adaptive immune response Ruslan Medzhitov and Charles A Janeway Jr. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9.
- Menzies, B.E., Kenoyer, A., 2006. Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect. Immun.* 74, 6847–6854.
- Miller, L.S., 2008. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatology* 24, 71–87.
- Milner, J.D., Brenchley, J.M., Laurence, A., Freeman, A.F., Hill, B.J., Elias, K.M., Kanno, Y., Spalding, C., Elloumi, H.Z., Paulson, M.L., Davis, J., Hsu, A., Asher, A.I., O’Shea, J., Holland, S.M., Paul, W.E.,

- Douek, D.C., 2008. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452, 773–6.
- Minegishi, Y., Karasuyama, H., 2009. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: Lessons from a primary immunodeficiency. *Int. Immunol.* 21, 105–112.
- Minegishi, Y., Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K., Yamada, M., Kawamura, N., Ariga, T., Tsuge, I., Karasuyama, H., 2009. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.* 206, 1291–301.
- Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., Pasic, S., Stojkovic, O., Metin, A., Karasuyama, H., 2007. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 448, 1058–1063.
- Mogensen, T.H., 2013. STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties. *JAK-STAT* 2, e23435-1–8.
- Nakatsuji, T., Gallo, R.L., 2012. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *J. Invest. Dermatol.* 132, 887–895.
- O'Neill, a. J., 2010. *Staphylococcus aureus* SH1000 and 8325-4: Comparative genome sequences of key laboratory strains in staphylococcal research. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 358–361.
- Oren, Z., Shai, Y., 1998. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Pept. Sci.* 47, 451–463.
- Pappu, R., Rutz, S., Ouyang, W., 2012. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol.* 33, 343–349.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C., 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.
- Patel, N.C., Gallagher, J.L., Torgerson, T.R., Gilman, A.L., 2015. Successful Haploidentical Donor Hematopoietic Stem Cell Transplant and Restoration of STAT3 Function in an Adolescent with Autosomal Dominant Hyper-IgE Syndrome. *J. Clin. Immunol.* 35, 479–485.
- Peschel, A., Sahl, H.G., 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 529–536.
- Peters, B.M., Shirtliff, M.E., Jabra-Rizk, M.A., 2010. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 6, 4–7.
- Pivarcsi, A., Koreck, A., Bodai, L., Széll, M., Szeg, C., Belso, N., Kenderessy-Szabó, A., Bata-Csörgo, Z.,

- Dobozy, A., Kemény, L., 2004. Differentiation-regulated expression of toll-like receptors 2 and 4 in HaCat keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 120–124.
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: An indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.
- Ramirez-Carrozzi, V., Sambandam, A., Luis, E., Lin, Z., Jeet, S., Lesch, J., Hackney, J., Kim, J., Zhou, M., Lai, J., Modrusan, Z., Sai, T., Lee, W., Xu, M., Caplazi, P., Diehl, L., de Voss, J., Balazs, M., Gonzalez, L., Singh, H., Ouyang, W., Pappu, R., 2011. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat. Immunol.* 12, 1159–1166.
- Reddy, P.K., Shekar, A., Kingston, J.J., Sripathy, M.H., Batra, H., 2013. Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of Alpha hemolysin of *Staphylococcus aureus* without staphylococcal protein A interference. *J. Immunol. Methods* 391, 31–38. doi:10.1016/j.jim.2013.02.004
- Roth, S.A., Simanski, M., Rademacher, F., Schro, L., 2014. The Pattern Recognition Receptor NOD2 Mediates *Staphylococcus aureus* – Induced IL-17C Expression in Keratinocytes 134, 374–380.
- Salmon, J.K., Armstrong, C.A., Ansel, J.C., 1994. Skin as an immune organ. *Dermatologica Sin.* 160, 146–152.
- Sawamura, D., Goto, M., Shibaki, A., Akiyama, M., McMillan, J.R., Abiko, Y., Shimizu, H., 2005. Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. *Gene Ther.* 12, 857–861.
- Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U., Berg, T., 2006. Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chem. Biol.* 13, 1235–1242. doi:10.1016/j.chembiol.2006.09.018
- Siddiquee, K., Zhang, S., Guida, W.C., Blaskovich, M. a, Greedy, B., Lawrence, H.R., Yip, M.L.R., Jove, R., McLaughlin, M.M., Lawrence, N.J., Sebt, S.M., Turkson, J., 2007. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7391–7396.
- Simanski, M., Dressel, S., Gläser, R., Harder, J., 2010. RNase 7 Protects Healthy Skin from *Staphylococcus aureus* Colonization. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2836–2838.
- Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Schumacher, H.M., Gläser, R., Harder, J., 2013. IL-17A and IFN- $\gamma$  Synergistically Induce RNase 7 Expression via STAT3 in Primary Keratinocytes. *PLoS One* 8, e59531.
- Sjoquist, J., Meloun, B., Hjelm, H., 1972. Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. *Eur. J. Biochem.* 29, 572–578.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S., 1997.



- Targeted disruption of the mouse Stat 3 gene leads to early embryonic lethality. *Developmental Biol.* 94, 3801–3804.
- Tosi, M.F., 2005. Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 241–249.
- Wiesner, J., Vilcinskas, A., 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1, 440–464.
- Winter, J., 2013. Using the Student ' s t -test with extremely small sample sizes. *Pr. Assessment, Res. Evalutaion* 18, 1–12.
- Wolf, R., Howard, Z.O.M., Dong, H.-F., Voscopoulos, C., 2008. Chemotactic activity of S100A7 is mediated by RAGE and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *Clin. Res.* 181, 1499–1506.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Seon, H.C., Wang, D., Watowich, S.S., Dong, C., 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.* 282, 9358–9363.
- Yong, P.F., Freeman, A.F., Engelhardt, K.R., Holland, S., Puck, J.M., Grimbacher, B., 2012. An Update on the Hyper IgE Syndrome. *arthritis Res.* 14, 1–10.
- Zanger, P., Holzer, J., Schleucher, R., Steffen, H., Schittek, B., Gabrysch, S., 2009. Constitutive Expression of the Antimicrobial Peptide RNase 7 Is Associated with Staphylococcus aureus Infection of the Skin. *J. Infect. Dis.* 200, 1907–1915.
- Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Nagaoka, I., Okumura, K., Ogawa, H., 2008. Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology* 124, 357–367.
- Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95–98.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32, 1–10.

# Anhang

MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwannenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. Jürgen Harder  
UKSH, Campus Kiel  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Schittenhelmstr. 7  
24105 Kiel

Postadresse:  
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9  
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-53 33  
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 22. März 2016

**AZ.:** D 442/16 (bitte stets angeben)  
**Studienplan:** Untersuchungen zur Bedeutung des Aryl Hydrocarbon Rezeptors (AhR) und des Inflammasoms für die kutane Abwehr  
Anschreiben vom 04.03.2016; Projektbeschreibung (DFG Vordruck Stand 06/15); Informationsblatt und Einverständniserklärung zur Entnahme und Untersuchung von Haaren bzw. überschüssiger Haut, undatiert

**Studienleiter und Antragsteller:** Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UKSH, Campus Kiel

**Antrag vom:** 04. März 2016 (Eingang: 15. März 2016)

**Nachreichung vom:** 21. März 2016  
Zustimmung Klinikdirektor Prof. Schwarz

Sehr geehrter Herr Prof. Harder,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung.  
Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

**Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:**

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.
3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.
4. Gemäß Deklaration von Helsinki muss der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. H. M. Mendhorn  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

  
Dr. med. Christine Glinicke  
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. T. Schwarz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Hautklinik der CAU Kiel.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. J. Harder. Seine unendliche Freude an der Wissenschaft hat mich die ganze Zeit begleitet und motiviert. Ich bin ihm sehr dankbar für seine Ideen und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Seine intensive Betreuung, die zahlreichen Ratschläge und die immer offene Tür waren von großem Nutzen für mich.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Kolleginnen Heilwig, Conny, Franzi, Lena und Maren in der Hautklinik. Ohne eure Unterstützung bei der praktischen Durchführung und euer immer offenes Ohr hätte ich diese Arbeit nicht geschafft. Zusätzlich möchte ich allen Mitarbeitern, MTAs und Doktoranden der Hautklinik Kiel danken, die mich in irgendeiner Weise unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern Petra und Henning für ihre Ratschläge und die bedingungslose Unterstützung, mit der sie mir meinen Werdegang bis jetzt ermöglicht haben. Zusätzlich möchte ich meinen Geschwistern Franziska und Thilo danken, die immer für mich da sind. Danke an Malte für seine Liebe und Unterstützung.

Danke!