

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

**Aktivierung angeborener Immunmechanismen
in der Haut durch Amyloid β**

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

vorgelegt von
Carolin Blatner

aus
Frankfurt am Main

Jahr
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Jürgen Schauber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Ewers
PD Dr. med. Ulrich Schüller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Yvonne Dombrowski

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2015

Für meine Liebsten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Haut.....	1
1.1.1	Mikroskopischer Aufbau der menschlichen Haut.....	1
1.1.2	Die Haut als immunologisches Organ	2
1.2	Das angeborene Immunsystem	3
1.2.1	Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	5
1.2.2	Inflammasomkomplexe.....	7
1.3	Interleukin-1 β als wichtiges proinflammatorisches Zytokin.....	9
1.3.1	Bedeutung von Interleukinen.....	9
1.3.2	Interleukin-1 β und dessen Bedeutung	10
1.3.3	Prozessierung von IL-1 β durch Caspase-1	10
1.3.4	Caspase-1-unabhängige IL-1 β -Prozessierung	11
1.3.5	IL-1 β -Sekretion und deren Kontrolle.....	12
1.4	Beta-Amyloid (A β).....	12
1.4.1	Struktur, Entstehung und Vorkommen.....	12
1.4.2	Funktionen von Beta-Amyloid.....	13
1.4.3	Entstehung aus Amyloid Precursor Protein	13
1.4.4	Zusammenhang zwischen Beta-Amyloid-Struktur und dessen Toxizität ..	15
1.5	Acne inversa (Hidradenitis suppurativa).....	16
1.5.1	Definition, Epidemiologie und Ätiologie	16
1.5.2	Diagnostik und Einteilung	17
1.5.3	Klinik und Therapie.....	17
1.6	Mögliche Bedeutung von Beta-Amyloid bei Acne inversa	18
1.7	Ziel der vorliegenden Untersuchung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Primäre humane epidermale Keratinozyten (HEKn)	21
2.2	Stimulation der primären Keratinozyten mit Beta-Amyloid 1-42	22
2.3	Herstellung von Beta-Amyloid-Monomeren.....	22
2.4	Analyse der Zellsignalwege durch Transfektion mit siRNA	23
2.5	Analyse der Zellsignalwege durch Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen ..	24
2.6	RNA-Isolation.....	24

2.6.1 Homogenisierung	24
2.6.2 Phasentrennung	24
2.6.3 RNA-Präzipitation	25
2.6.4 Waschen der RNA	25
2.6.5 Neuauflösung der RNA	25
2.7 cDNA-Synthese	26
2.8 Semi-quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.8.1 Denaturierung	28
2.8.2 Primerhybridisierung	28
2.8.3 Elongation	28
2.9 Interleukin-1 β -Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IL-1 β -ELISA)	29
2.10 Interleukin-18-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IL-18-ELISA)	31
2.11 Interferon- β -Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IFN- β -ELISA)	32
2.12 Zytotoxizitäts-Assays	33
2.12.1 WST-1-Assay	33
2.12.2 Kristallviolett-Assay	34
2.12.3 BrdU-Assay	34
2.13 Immunhistochemie	35
2.14 Statistik	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Vorkommen von Beta-Amyloid in der menschlichen Haut	37
3.1.1 Nachweis von Beta-Amyloid in der Haut von Acne inversa Patienten	37
3.1.2 Nachweis von Beta-Amyloid auch in Kontrollhaut (Narbe)	39
3.2 Proinflammatorische Wirkung von Beta-Amyloid	40
3.2.1 Amyloid β bewirkt eine IL-1 β -Freisetzung aus primären Keratinozyten	40
3.2.2 Amyloid β hat keinen Einfluss auf die IL-18-Sekretion	44
3.2.3 Amyloid β bewirkt eine IFN- β -Freisetzung aus primären Keratinozyten	44
3.2.4 Amyloid β bewirkt auch auf Gen-Ebene eine IFN- β -Induktion in HEK293T	46
3.3 Beta-Amyloid ist nicht zytotoxisch für Keratinozyten	48
3.4 Mechanismus der Zytokinsekretion	51
3.4.1 Die IL-1 β -Sekretion erfolgt NLRP3-unabhängig	51
3.4.2 Die IL-1 β -Sekretion erfolgt unabhängig von Matrix-Metalloproteinasen	52
3.4.3 Die IL-1 β -Sekretion erfolgt TLR2-unabhängig	53

3.4.4 MyD88 als Mediator der Signalkaskade	54
4 Diskussion	58
4.1 Mögliche Ursachen der Inflammation bei Acne inversa	58
4.2 Kofaktoren mit möglichem Einfluss auf die Entzündung bei Acne inversa	61
4.3 Mechanismen der Inflammation durch Amyloid β bei Alzheimer	62
4.4 Mögliche Mechanismen der Inflammation durch Amyloid β in Keratinozyten..	65
4.5 Klinische Relevanz.....	69
5 Zusammenfassung	72
6 Abkürzungsverzeichnis.....	74
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
8 Literaturverzeichnis	83
9 Danksagung	89
10 Eidesstattliche Versicherung	90

1 Einleitung

1.1 Die Haut

1.1.1 Mikroskopischer Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut besteht aus drei Schichten (Abbildung 1). Epidermis und Dermis bilden die Kutis. Darunter befindet sich die Subkutis, eine subkutane Fettschicht (Moll, 2010).

Die Epidermis hat als oberste Hautschicht ständigen Kontakt mit der Umwelt und übernimmt somit die erste Abwehrfunktion gegen Pathogene. Sie besteht zum Großteil aus Keratinozyten, die in ihrem Reifungsprozess immer weiter an die Oberfläche wandern und schließlich als terminal differenzierte, kernlose Zellen an der Hautoberfläche die Hornschicht bilden (Feldmeyer et al., 2010). In der untersten Epidermisschicht, dem *Stratum basale*, befinden sich die Basalzellen, die durch mitotische Teilung für eine ständige Erneuerung der Epidermis sorgen. Die Tochterzellen durchwandern *Stratum spinosum* sowie *Stratum granulosum* und erreichen schließlich das *Stratum corneum*. Nach etwa 28 Tagen werden sie abgestoßen. In der Leistenhaut an *Palmae* und *Plantae* bildet das *Stratum lucidum*, in dem die Zellen optisch heller erscheinen, die unterste Schicht des *Stratum corneum*. In der Epidermis finden sich weiterhin noch wenige Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen und Lymphozyten, allerdings machen die Keratinozyten mit über 90 % den größten Teil aus. Zwischen Epidermis und Dermis befindet sich die dermoepidermale Junctionszone, eine Basalmembran, die den Austausch von Molekülen zwischen verschiedenen Zellen kontrolliert. Sie besteht aus *Lamina lucida* und *Lamina densa* und gewährleistet sowohl eine hohe mechanische Festigkeit als auch genügend Elastizität (Braun-Falco, 2005, Moll, 2010).

Die darunter liegende Dermis wird unterteilt in *Stratum papillare* und *Stratum reticulare*. Sie besteht vor allem aus Kollagenfasern, was für eine hohe Stabilität bei ausreichender Dehnbarkeit sorgt. Vorwiegend handelt es sich hierbei um Typ-I-Kollagen, daneben findet sich auch etwas Typ-III-Kollagen. Die Kollagenfasern sind zusammen mit elastischen Fasern, die ebenfalls in der Dermis zu finden sind, in eine

extrazelluläre Matrix eingebettet, die hauptsächlich aus Proteoglykanen besteht. Die Synthese aller Fasern und der Matrix übernehmen Fibroblasten, die in dieser Schicht die dominierende Zellart darstellen. Des Weiteren sind in der Dermis Makrophagen, Mastzellen, Langerhans-Zellen und Lymphozyten zu finden. Für eine reichhaltige Vaskularisation und adäquate Temperaturregulation sorgen zwei Gefäßplexus (Moll, 2010, Hengge, 2006).

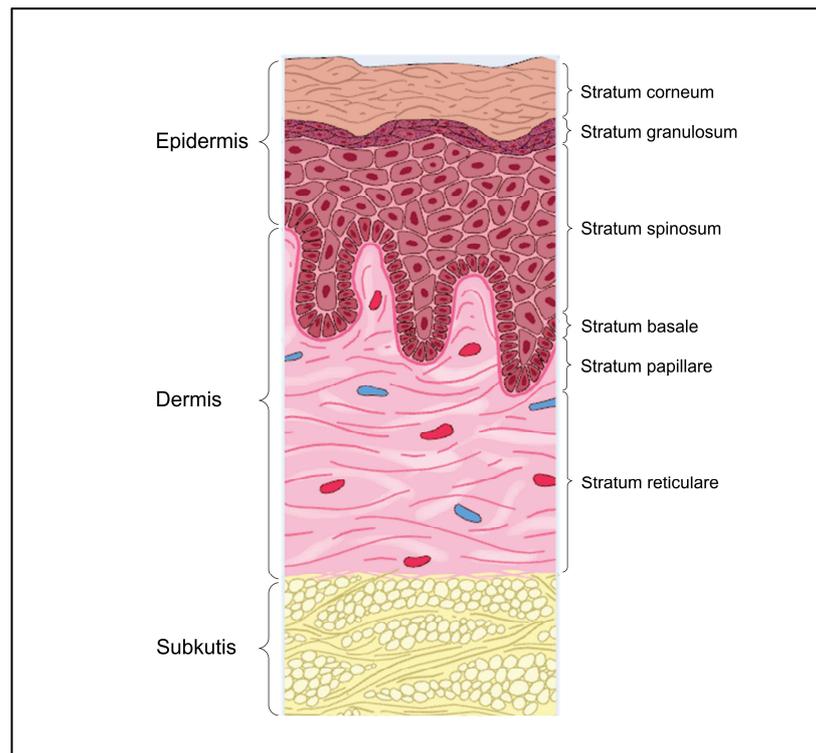


Abbildung 1: Mikroskopische Struktur der Haut.

Schematische Darstellung von Epidermis, Dermis und Subkutis und deren einzelnen Schichten (adaptiert nach Moll, 2010).

1.1.2 Die Haut als immunologisches Organ

Da die Haut in ständigem Kontakt mit der Umwelt steht, hat sie eine wichtige Funktion in der ersten Abwehr von Pathogenen. Dabei muss sie fremde Mikroorganismen zuverlässig erkennen und eliminieren, jedoch muss eine zu exzessive Immunantwort vermieden werden, da dies Autoimmunität und chronische Entzündung zur Folge haben würde. Obwohl Keratinozyten keine professionellen Immunzellen sind, haben sie trotzdem eine sehr wichtige Rolle in der Immunantwort (Feldmeyer et al., 2010). Hierzu verfügt die Haut über eine Biofilmschicht, die antimikrobiell wirkt durch einen sauren pH von 5,5 und antimikrobielle Substanzen

(Rassner, 2007). Keratinozyten sind eine wichtige Quelle dieser antimikrobiellen Peptide (AMP), wie beispielsweise Cathelicidine und β -Defensine (Schauber and Gallo, 2008). Sie sind in der Lage aktiv antimikrobiell zu wirken und können zudem zelluläre Abwehrmechanismen rekrutieren (Bardan et al., 2004). Außerdem exprimieren die Hautzellen Toll-like Rezeptoren (TLRs) an ihrer Oberfläche, die über intrazelluläre Signalwege zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führen (Lebre et al., 2007). Intrazellulär finden sich Inflammasomkomplexe, die mit Caspase-1 ebenfalls zur Prozessierung und damit Aktivierung von Zytokinen, wie IL-1 β und IL-18, führen (Contassot et al., 2012). In der Haut zählen Keratinozyten zu der Hauptquelle von Interleukin-1 β , einem der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine (Feldmeyer et al., 2010).

All dies sind Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Im menschlichen Organismus spielen jedoch angeborenes und erworbenes Immunsystem zusammen. Die angeborene Abwehr setzt zuerst ein und richtet sich vorerst gegen alle eingedrungenen Erreger. Die erworbene, spezifische Abwehr reagiert langsamer und erzeugt eine zielgerichtete immunologische Antwort (Moll, 2010).

Die Herstellung einer Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem übernehmen in der Haut epidermale dendritische Zellen (Langerhans-Zellen). Sie agieren als Antigen-präsentierende Zellen, indem sie das Fremdartigen bei Erstkontakt aufnehmen, es prozessieren und an ihrer Oberfläche zum drainierenden Lymphknoten transportieren. Die dort befindlichen naiven Antigen-spezifischen T-Zellen werden nach Erkennen und Binden des Antigens aktiviert und differenzieren zu T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen. Sie führen daraufhin zur Reifung von B-Lymphozyten und zur Ausbildung spezifischer Antikörper (Hengge, 2006).

1.2 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Immunantwort kann innerhalb von Minuten bis Stunden auf eingedrungene Mikroorganismen reagieren und somit eine Eingrenzung der Infektion bewirken. Zum angeborenen Immunsystem gehören vor allem natürliche Killerzellen und phagozytierende Zellen, wie beispielsweise Makrophagen und Granulozyten,

aber auch humorale Komponenten, wie Komplementsystem und antimikrobielle Peptide (Hengge, 2006).

Auf molekularer Ebene sind die so genannten *pattern recognition receptors* (PRRs) von Bedeutung. Dies sind Rezeptoren, die von Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten, aber auch von Nicht-Immunzellen, wie Keratinozyten, exprimiert werden (Schroder and Tschopp, 2010). Zu ihnen gehören zum einen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die C-Typ Lectin Rezeptoren (CLRs), die beide an der Zelloberfläche oder an Membranen von Zellkompartimenten, wie Endosomen, Lysosomen oder Endoplasmatischem Retikulum, exprimiert werden (Stutz et al., 2009). Zum anderen sind im Zytosol NOD-like Rezeptoren (NLRs) und RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) vorhanden, die für die Erkennung von intrazellulären Gefahrensignalen zuständig sind (Bauernfeind et al., 2010). All diese PRRs erkennen so genannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) (Creagh and O'Neill, 2006). Einige von ihnen, beispielsweise die TLRs, sind auch in der Lage, *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) zu detektieren. PAMPs sind Gefahrensignale mit mikrobiellem Ursprung, DAMPs sind potenziell schädliche endogene Faktoren (de Koning et al., 2012, Bauernfeind et al., 2010). Das angeborene Immunsystem kann also durch das Erkennen von PAMPs die eingedrungenen Pathogene entdecken, durch DAMPs bemerkt es allerdings auch den durch sie verursachten Schaden (Martinon et al., 2009).

Aktivierung der *pattern recognition receptors* führt über verschiedene Signaltransduktionswege letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, insbesondere von NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), der zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ I Interferonen führt (Schroder and Tschopp, 2010).

Das angeborene Immunsystem ist sehr eng mit dem erworbenen verknüpft. Das erworbene Immunsystem, zu dem B- und T-Lymphozyten mit ihren hochspezifischen Rezeptoren gehören, greift zwar langsamer, aber deutlich gezielter in die Immunantwort ein und verfügt über die Fähigkeit, so genannte Gedächtniszellen auszubilden, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnelle und starke Abwehr gewährleisten (Hengge, 2006).

1.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren sind Membranproteine vom Typ I, die an der Zelloberfläche und in endosomalen Kompartimenten exprimiert werden. Im menschlichen Individuum sind bisher 10 funktionelle Mitglieder der TLR-Familie bekannt (Kawai and Akira, 2006). TLR2 (TLR1/2 und TLR2/6), TLR4, TLR5 und TLR10 befinden sich an der Zelloberfläche, wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Brown et al., 2011). Allen TLRs gemeinsam ist eine extrazellulär gelegene N-terminale Domäne, bestehend aus Leucin-reichen Wiederholungen (*leucin-rich repeats*, LRR), und eine intrazelluläre C-terminale Toll-IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne, die mit zahlreichen Adaptermolekülen interagiert und so nachgeschaltete Signaltransduktionswege aktiviert (Kumar et al., 2009). Nach Aktivierung des TLR findet zunächst eine Dimerisierung oder Oligomerisierung statt. TLR2 formt dabei ein heterophiles Dimer mit TLR1 oder TLR6, andere TLRs hingegen formen Homodimere (Takeda and Akira, 2005). TLR10 kann sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit TLR1 und TLR2 formen (Hasan et al., 2005). Anschließend kommt es zur Rekrutierung des entsprechenden Adaptermoleküls. TLRs benutzen fünf Adaptermoleküle: *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88), *MyD88 adaptor-like/Toll-Interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein* (Mal/TIRAP), *TIR domain-containing adaptor-inducing Interferon- β* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und *sterile alpha (SAM) and HEAT/Armadillo (ARM)-containing protein* (SARM) (Gay and Gangloff, 2007). Letztendlich führt die sich anschließende Signalkaskade zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und *Interferon Regulatory Factors* (IRFs). Dadurch wird die Transkription von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ I Interferonen induziert (Abbildung 2) (Kumar et al., 2009).

Die verschiedenen TLRs erkennen unterschiedliche Gefahrensignale (Tabelle 1). TLR2 erkennt eine Vielfalt an mikrobiellen Komponenten, wie beispielsweise Peptidoglykan grampositiver Bakterien und Lipoarabinomannan (LAM) von Mykobakterien. Als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 bindet TLR2 Lipoproteine. Virale doppelsträngige RNA wird von TLR3 erkannt, einzelsträngige RNA von TLR7 und TLR8. Lipopolysaccharid (LPS) ist der Ligand von TLR4, Flagellin der von TLR5. Signale von unmethylierten CpG Motiven, die in bakterieller DNA vorhanden sind, werden von TLR9 erkannt. Der Ligand von TLR10 ist noch unbekannt (Lebre et al.,

2007, Kumar et al., 2009, Newton and Dixit, 2012, Takeda and Akira, 2005, Hasan et al., 2005)

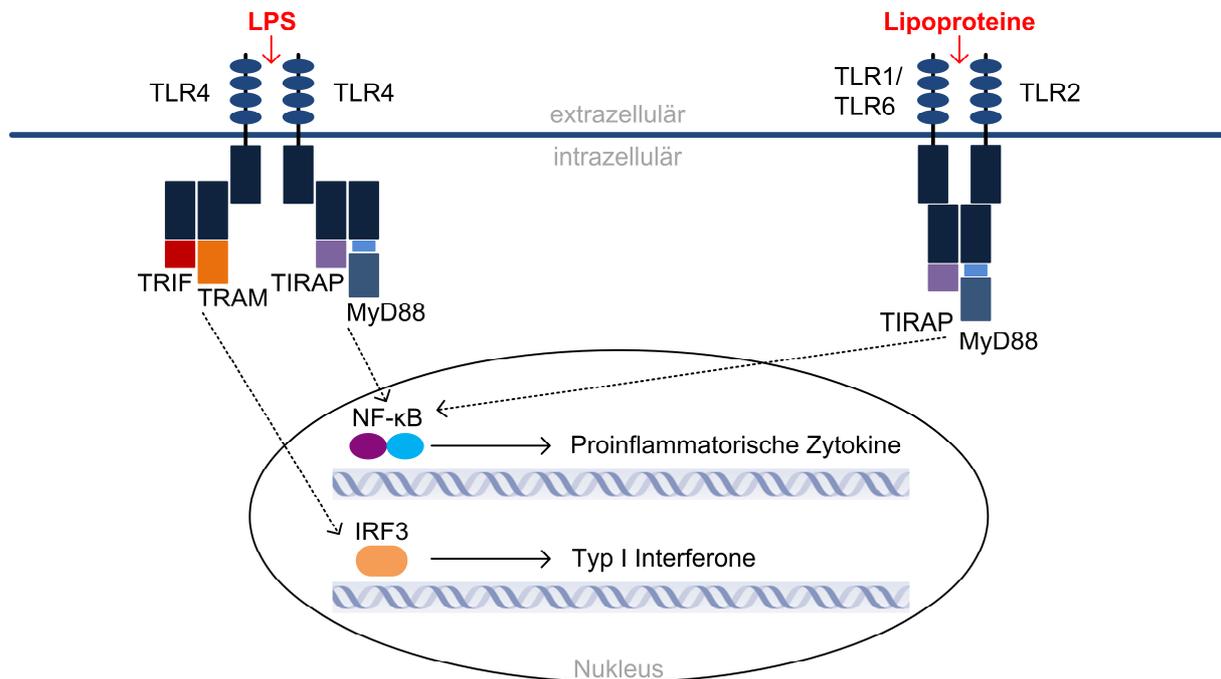


Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege.

Nach Erkennung des für den jeweiligen TLR spezifischen Aktivierungssignals bilden sich TLR-Dimere aus und über verschiedene Adaptermoleküle werden Signalwege initiiert, die letztendlich in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und IRF enden (adaptiert nach de Koning, 2012).

TLR	TLR-Lokalisation	Ligand	Adaptermolekül	Transkriptionsfaktor
TLR1/2	Plasmamembran	Triacyllipopeptide	TIRAP, MyD88	NF-κB
TLR2	Plasmamembran	Peptidoglykan (grampositive Bakterien), LAM (Mykobakterien), Hemagglutinin (Masernvirus), Phospholipomannan (Candida), Glykosylphosphatidylinositol-Anker (Trypanosoma cruzi)	TIRAP, MyD88	NF-κB
TLR3	Endosom	virale dsRNA	TRIF	NF-κB, IRF3, IRF7
TLR4	Plasmamembran	LPS (gramnegative Bakterien)	TIRAP, MyD88, TRAM, TRIF	NF-κB, IRF3, IRF7
TLR5	Plasmamembran	Flagellin	MyD88	NF-κB
TLR6/2	Plasmamembran	Diacyllipopeptide	TIRAP, MyD88	NF-κB
TLR7	Endosom	virale ssRNA	MyD88	NF-κB, IRF7
TLR8	Endosom	virale ssRNA	MyD88	NF-κB, IRF7
TLR9	Endosom	CpG Motive	MyD88	NF-κB, IRF7
TLR10	Plasmamembran	unbekannt	MyD88	NF-κB

Tabelle 1: Die verschiedenen TLRs und ihre Eigenschaften.

Dargestellt sind die verschiedenen TLRs, ihre Lokalisation, ihre Liganden sowie ihre Adaptermoleküle und Transkriptionsfaktoren (Hasan et al., 2005, Kumar et al., 2009, Brown et al., 2011).

Auch Keratinozyten exprimieren TLRs. Die mRNA für TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 und TLR10 wird von ihnen kontinuierlich exprimiert, die für TLR7 und TLR8 hingegen nicht (Lebre et al., 2007).

1.2.2 Inflammasomkomplexe

Bei der intrazellulären Erkennung von Gefahrensignalen spielen vor allem NOD-like Rezeptoren (NLR) eine wichtige Rolle. Bisher sind im menschlichen Organismus 22 NLR Gene bekannt. NLRs sind im Zytoplasma lokalisierte Immunrezeptoren, die eine dreiteilige Struktur aufweisen. Ihr C-terminales Ende besteht aus *leucin-rich repeats* (LRR), die für die Ligandenerkennung zuständig sind. Zentral besitzen sie eine NACHT-Domäne, die üblicherweise mit einer weiteren Domäne, der *NACHT-associated domain* (NAD), assoziiert ist und deshalb zusammengefasst häufig als *nucleotide-binding domain* (NBD) bezeichnet wird. Am N-terminalen Ende befindet sich die Effektor-Domäne, die die weiteren Signalwege initiiert (Bauernfeind et al., 2010). NLRs erkennen intrazelluläre PAMPs oder DAMPs im Zytoplasma und formen bei Aktivierung entweder direkt oder, falls nötig, über das Adaptermolekül *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) mit inflammatorischen Caspasen einen Komplex, der Inflammasom genannt wird (Martinon et al., 2009). Unter den Caspasen spielt vor allem Caspase-1 eine wichtige Rolle (Keller et al., 2008). Dies ist eine intrazelluläre Cysteinprotease, die das N-terminale Ende von pro-IL-1 β abspaltet, wodurch die aktive Form des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β entsteht (Dinarello, 2011). In Abwesenheit von aktivierenden Faktoren liegt Caspase-1 in der Zelle als inaktive pro-Caspase-1 vor. Erst bei Erkennung von Gefahrensignalen kommt es nach Bindung des Liganden zur Formation eines Inflammasoms, indem NOD-like Rezeptoren, falls nötig, über ASC an pro-Caspase-1 binden, was zu deren Aktivierung führt (Abbildung 3) (Contassot et al., 2012). Hierbei wird das Pro-Enzym zunächst in eine 20 kDa (p20) und eine 10 kDa (p10) Untereinheit gespalten. Durch Bildung eines Heterotetramers, welches aus zwei p20- und zwei p10-Untereinheiten besteht, entsteht aktive Caspase-1 (Stutz et al., 2009). Ob für die Bindung von NLRs an Caspase-1 das Adaptermolekül ASC notwendig ist, hängt von dem N-terminalen Ende der NLRs ab. Dort besitzen die meisten NOD-like Rezeptoren eine *death-fold domain* (DD), die entweder aus einer *caspase recruitment domain* (CARD) oder einer *pyrin domain* (PYD) besteht. Da Caspase-1 an ihrem Ende eine CARD besitzt und

death-fold domains üblicherweise Dimere oder Multimere mit Mitgliedern aus ihrer eigenen Subfamilie bilden, benötigen NLRs mit einer PYD für die Bindung an Caspase-1 das Adaptermolekül ASC. Dieses kann über seine PYD eine Bindung mit dem entsprechenden NLR eingehen und seine CARD kann dann Caspase-1 rekrutieren. Je nach N-terminalem Ende unterscheidet man folgende NLRs: NLRAs (NLRs mit *acidic activation domain*), NLRBs (NLRs mit *BIR domain*), NLRCs (NLRs mit einer *caspase recruitment domain*), NLRPs (NLRs mit einer *pyrin domain*) und NLRXs (NLR-Familie mit keiner strengen Homologie zur N-terminalen Domäne eines Mitglieds einer anderen NLR-Subfamilie) (Bauernfeind et al., 2010). Neben den NLRs mit dreiteiliger Struktur gibt es ein weiteres im Zytosol lokalisiertes Protein, genannt AIM2, welches aus einer N-terminalen HIN-200- und einer C-terminalen Pyrin-Domäne besteht und ebenfalls in der Lage ist, über ASC einen Inflammasomkomplex mit Caspase-1 zu formen (Alnemri, 2010). All diese unterschiedlichen Gefahrensensoren haben verschiedene Aktivatoren. NLRP3, beispielsweise, wird durch Poren-formende Toxine, DAMPs, aber auch exogene Kristalle aktiviert (Feldmeyer et al., 2010). Auch fibrilläre β -Amyloid Peptide, die sich bei Alzheimer im Gehirn in Form von Plaques ablagern, führen zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms (Schroder and Tschopp, 2010). AIM2 erkennt doppelsträngige DNA und spielt vor allem in der Pathogenese der Psoriasis eine wichtige inflammatorische Rolle (Hornung et al., 2009, Dombrowski et al., 2011). Im Gegensatz zu NLRPs, die ihre aktivierenden Signale vermutlich über einen indirekten Mechanismus erkennen, bindet AIM2 direkt an dsDNA und bewirkt dadurch die Ausbildung des AIM2-Inflammasomkomplexes (Feldmeyer et al., 2010).

Caspase-1 kann neben pro-IL-1 β auch weitere Mitglieder der IL-1-Familie spalten, beispielsweise pro-IL-18 und pro-IL-33. IL-18 wird dabei ebenfalls aktiviert, IL-33 hingegen wird durch Caspase-1-abhängige Prozessierung inaktiviert (Stutz et al., 2009). Nach Aktivierung von IL-1 β und IL-18 werden diese Zytokine aus der Zelle sezerniert, allerdings gelangt mit ihnen auch aktive Caspase-1, bestehend aus den Untereinheiten p10 und p20, in den Extrazellularraum (Keller et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass Caspase-1 auch extrazelluläre Funktionen besitzt oder beim Export der Zytokine eine Rolle spielt. Außerdem könnte diese schnelle Caspase-1-Freisetzung nach Aktivierung auch ein wichtiger Regulationsmechanismus sein, um die zytosolische Aktivität dieser Caspase zu limitieren (Schroder and Tschopp, 2010).

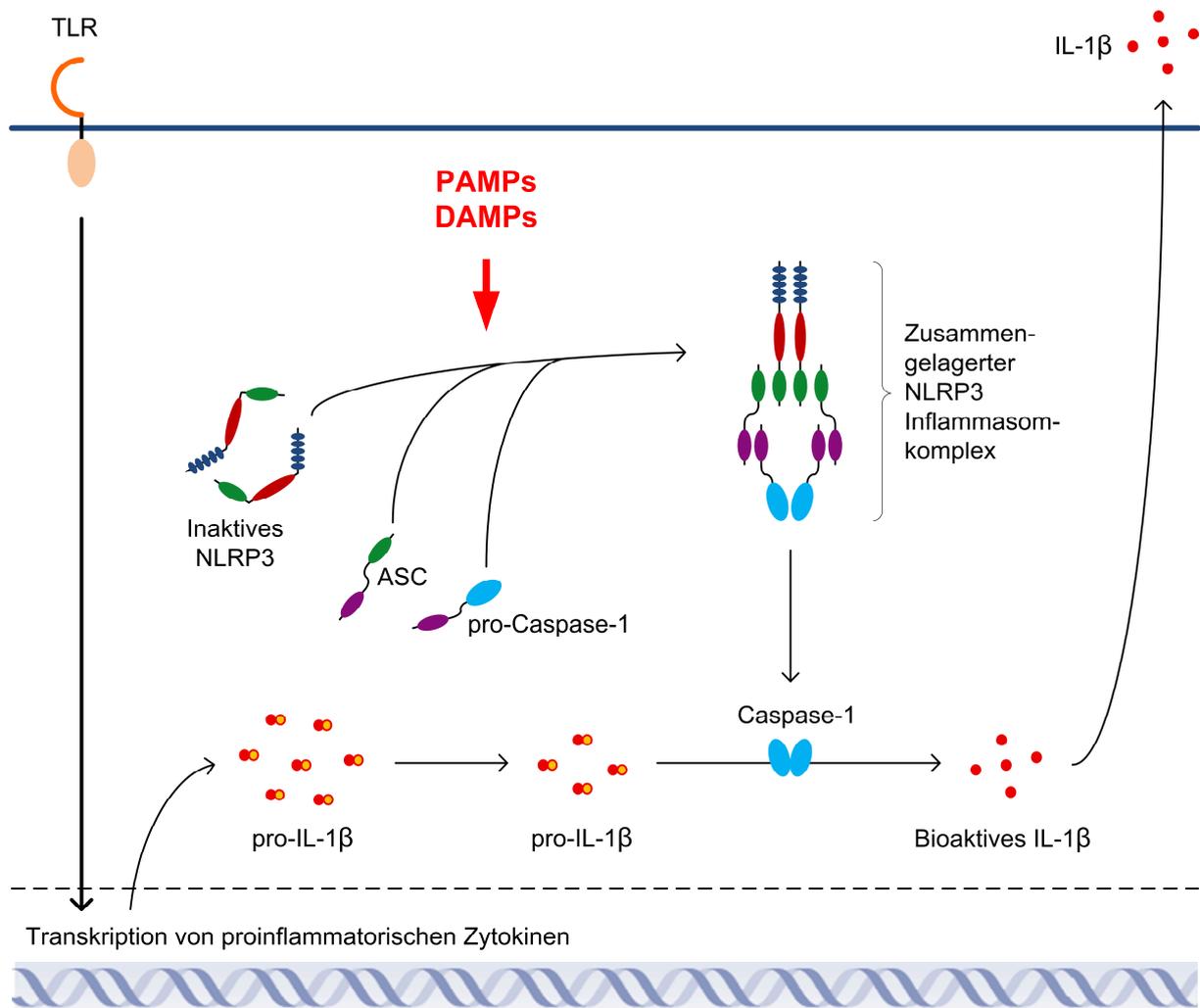


Abbildung 3: Formation eines Inflammasomkomplexes.

Nach Aktivierung durch PAMPs oder DAMPs kommt es intrazellulär zur Formation eines Inflammasomkomplexes. Die dadurch aktivierte Caspase-1 führt zur proteolytischen Spaltung und somit Aktivierung von pro-IL-1 β , welches dann als bioaktives IL-1 β aus der Zelle sezerniert wird (adaptiert nach Bauernfeind, 2010).

1.3 Interleukin-1 β als wichtiges proinflammatorisches Zytokin

1.3.1 Bedeutung von Interleukinen

Interleukine sind Zytokine, die zu den Mediatoren des Immunsystems zählen und die Kommunikation zwischen den verschiedenen an der Immunantwort beteiligten Zellen, beispielsweise Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten, regulieren. Somit haben Interleukine Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen sowie Nicht-Immunzellen. Alle Zellarten, einschließlich Keratinozyten, können Zytokine bilden, allerdings ist jede Zelle nur zur Bildung bestimmter Zytokine fähig. In Keratinozyten werden die Interleukine IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12,

IL-15, IL-17, IL-18 und IL-23 exprimiert (Nestle et al., 2009, Suter et al., 2009). IL-1 β und IL-6 gehören zu den wichtigsten proinflammatorischen Mediatoren und können auch systemische Effekte hervorrufen. Manche Interleukine wirken allerdings auch antientzündlich (Rassow, 2008, Braun-Falco, 2005).

1.3.2 Interleukin-1 β und dessen Bedeutung

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der Interleukin-1-Familie, die aus elf Zytokinen besteht. Die am gründlichsten untersuchten Zytokine aus dieser Familie sind IL-1 α , IL-1 β , IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) und IL-18 (Dinarello, 2009). Bis auf IL-1Ra werden alle Zytokine der IL-1-Familie als Vorläufer-Proteine synthetisiert. IL-1 β ist in seiner Precursor-Form pro-IL-1 β nicht aktiv und muss zunächst intrazellulär durch Caspase-1 oder extrazellulär durch Proteasen gespalten werden. Nach intrazellulärer Spaltung von pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β wird diese nun reife Form aus der Zelle sezerniert (Dinarello, 2011). IL-1 β kann seine eigene Expression durch Aktivierung von MyD88 über Binden von IL-1R (IL-1 Rezeptor) induzieren (Bauernfeind et al., 2010).

Interleukin-1 β ist ein endogenes Pyrogen, das bei der Entstehung von Fieber eine entscheidende Rolle spielt (Dinarello, 2010). Da das Zytokin bei vielen Erkrankungen, wie beispielsweise Rheumatoider Arthritis und Diabetes mellitus Typ 2, in der Pathogenese eine große Rolle spielt, gibt es mittlerweile Therapieansätze mit IL-1 β -Blockern (Dinarello, 2011). Blockieren von IL-1 β reduziert zwar die Inflammation, gleichzeitig erhöht dies aber die Infektanfälligkeit (Dinarello, 2010).

1.3.3 Prozessierung von IL-1 β durch Caspase-1

Intrazellulär kann IL-1 β durch Caspase-1, früher auch als *IL-1-converting enzyme* (ICE) bekannt, aktiviert werden. Caspase-1 liegt zunächst als katalytisch inaktive pro-Caspase-1 vor und wird durch die Ausbildung eines Inflammasomkomplexes in ihre aktive Form gespalten, wodurch sie in der Lage ist, selbst proteolytisch aktiv zu werden (Stutz et al., 2009). Die Caspase-1-abhängige Spaltung von pro-IL-1 β zu reifem IL-1 β kann entweder in speziellen sekretorischen Lysosomen oder im

Zytoplasma stattfinden (Dinarello, 2009). Die aktive Form kann, wie in 1.3.5 beschrieben, auf unterschiedlichen Wegen aus der Zelle freigesetzt werden.

1.3.4 Caspase-1-unabhängige IL-1 β -Prozessierung

Neben der intrazellulären Spaltung von pro-IL-1 β durch Caspase-1 kann IL-1 β auch extrazellulär durch verschiedene Proteasen prozessiert werden. Dazu gehören von Neutrophilen stammende Serinproteasen oder Proteasen, die aus mikrobiellen Pathogenen freigesetzt werden (Netea et al., 2010). Unter anderem können Proteinase-3, Elastase, Chymase, Granzym A und Cathepsin G zu einer Aktivierung von IL-1 β führen (Abbildung 4). Vor allem Proteinase-3 spielt dabei eine wichtige Rolle, da sie pro-IL-1 β nahe der Schnittstelle von Caspase-1 spaltet (Dinarello, 2011). Das durch diese Protease entstehende Spaltprodukt ist ebenfalls biologisch aktiv (Dinarello, 2009).

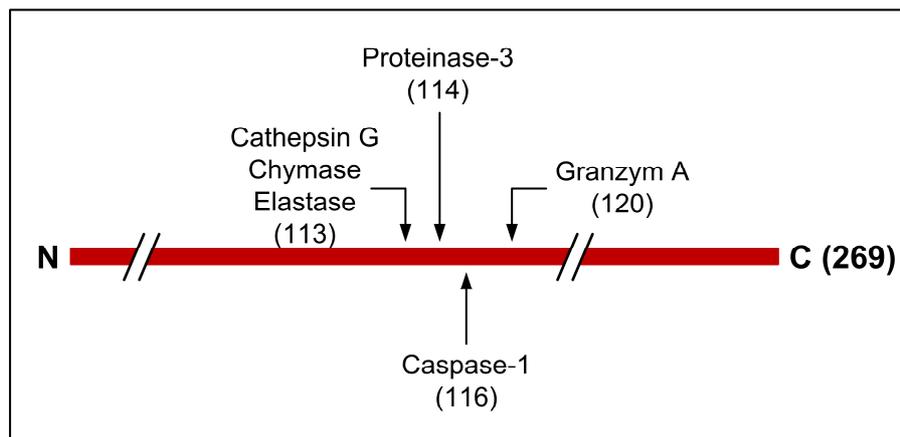


Abbildung 4: Spaltungsstellen von pro-IL-1 β .

Das 269 Aminosäuren lange Precursor Protein pro-IL-1 β kann durch Caspase-1 an Position 116 gespalten werden. Weitere Proteasen sind in der Lage, pro-IL-1 β zu spalten. Die Schnittstelle von Proteinase-3 liegt dabei besonders nah an der von Caspase-1, weshalb durch dessen Spaltung ebenfalls biologisch aktives IL-1 β entsteht (adaptiert nach Dinarello, 2011).

Des Weiteren können Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zur Entstehung von aktivem IL-1 β führen (Schonbeck et al., 1998). Dies sind Proteasen, die Ca²⁺-abhängig sind und in ihrem aktiven Zentrum Zink als Katalysator haben (Rassow, 2008). Davon sind Stromelysin-1 (MMP-3) und die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) in der Lage, pro-IL-1 β zu prozessieren und biologisch aktives IL-1 β zu produzieren. Die Inkubation mit Stromelysin-1 führt bereits nach einer Stunde zu einer Aktivierung von IL-1 β , die biologische Aktivität nimmt jedoch nach 8 – 24 Stunden ab. Gelatinase A führt erst nach 24 – 48 Stunden Inkubationszeit und nur in hohen Konzentrationen zu

einer IL-1 β -Aktivierung, wohingegen geringe Konzentrationen an Gelatinase B bereits nach Minuten zu einer Prozessierung von IL-1 β führen (Schonbeck et al., 1998).

1.3.5 IL-1 β -Sekretion und deren Kontrolle

Da IL-1 β als sehr potentes endogenes Pyrogen nicht unkontrolliert sezerniert werden darf, unterliegt die Sekretion einer strengen Regulation (3-Stufen-Regulation). Zum einen wird die pro-IL-1 β -mRNA nicht kontinuierlich exprimiert, sondern benötigt zunächst eine Induktion über NF- κ B-aktivierende Signalwege („Signal 1“). Außerdem wird IL-1 β in seiner Vorläuferform produziert und benötigt eine Aktivierung durch Caspase-1, welche durch Inflammassombildung aktiviert wird („Signal 2“). Die Aktivierung der Inflammassome unterliegt wiederum ebenfalls einer strikten Kontrolle. Des Weiteren wird die Sekretion von IL-1 β reguliert, was ebenfalls dazu führt, dass es zu keiner unkontrollierten Freisetzung kommt („Signal 3“) (Bauernfeind et al., 2010). Die Freisetzung von IL-1 β nach Prozessierung durch Caspase-1 kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Zum einen können die speziellen sekretorischen Lysosomen unter Kontrolle von Phospholipase C und A2 externalisiert werden, jedoch kann IL-1 β auch durch Abspaltung von Plasmamembran-Mikrovesikeln freigesetzt werden. Des Weiteren kann die Freisetzung über Transporter oder Exosomen erfolgen (Dinarello, 2009).

1.4 Beta-Amyloid (A β)

1.4.1 Struktur, Entstehung und Vorkommen

Beta-Amyloid ist ein 39 bis 43 Aminosäuren langes Peptid, das durch proteolytische Spaltung von Amyloid Precursor Protein (APP) entsteht (Pearson and Peers, 2006). Es wird als Monomer in die Endosomen oder den Extrazellulärraum freigesetzt und kann sich unter physiologischen Bedingungen zu löslichen Dimeren, Trimeren, Oligomeren und Protofibrillen zusammenlagern oder es kann zu unlöslichen Amyloidfibrillen aggregieren (Abbildung 5) (Ryan et al., 2010). Der A β ₂₅₋₃₅-Teilbereich beinhaltet viele der toxischen Eigenschaften dieses Peptids (Pearson and Peers, 2006).

Beta-Amyloid kommt extrazellulär vor allem als 40 Aminosäuren langes Peptid ($A\beta_{40}$) und nur zu geringeren Anteilen als 42 Aminosäuren langes Peptid ($A\beta_{42}$) vor. Es entsteht intrazellulär während der Spaltung des Amyloid Precursor Proteins. Der Hauptanteil an Beta-Amyloid wird aus der Zelle sezerniert und lagert sich in Form von extrazellulären Plaques ab. An der Sekretion sind Endosomen und der Golgi-Apparat beteiligt. Intrazellulär findet man in Lysosomen und dem endoplasmatischen Retikulum einen Pool aus nicht-sezernierbarem Beta-Amyloid, der vor allem aus $A\beta_{42}$ -Aggregaten besteht (Schmitz et al., 2002).

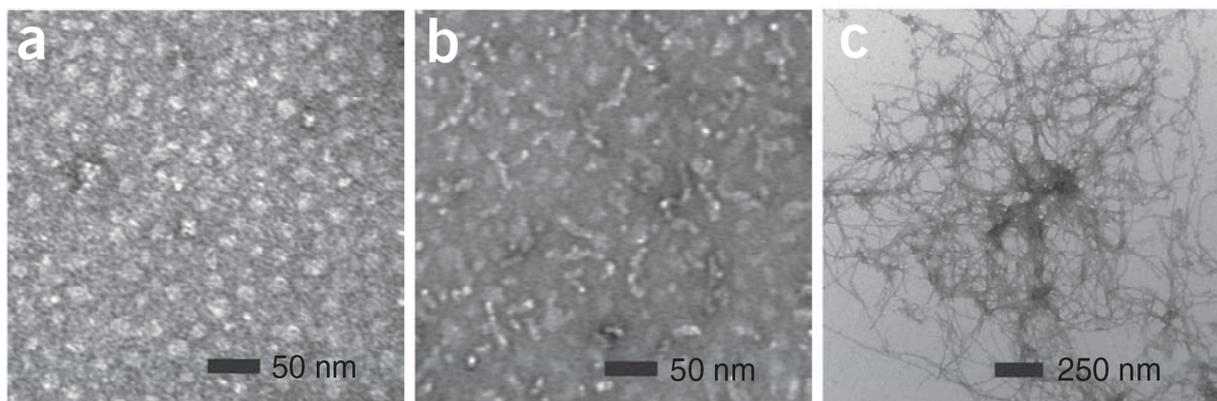


Abbildung 5: Transmissionselektronenmikroskopie verschiedener $A\beta_{42}$ -Konformationen.
a) Oligomere, b) Protofibrillen, c) Fibrillen (Ahmed et al., 2010).

1.4.2 Funktionen von Beta-Amyloid

Beta-Amyloid ist vor allem in Hinsicht auf Morbus Alzheimer und seine toxische Wirkung auf neuronale Zellen bei Aggregation untersucht. Das Peptid erfüllt allerdings auch eine Reihe an physiologischen Funktionen im zentralen Nervensystem. Dazu gehören die Modulation bzw. Kontrolle synaptischer Aktivitäten sowie der Schutz vor exzessiver Glutamatproduktion. Auch bei gesunden Individuen ohne Anzeichen von Demenz sind kleine Mengen dieses Proteins im zerebrospinalen Liquor messbar und *in vitro* konnte sogar nachgewiesen werden, dass es in Abwesenheit von Beta-Amyloid zu neuronalem Zelltod kommt (Pearson and Peers, 2006).

1.4.3 Entstehung aus Amyloid Precursor Protein

Beta-Amyloid entsteht bei der Spaltung des Transmembranproteins Amyloid Precursor Protein (APP). APP wird von einem Gen kodiert, das aus mindestens 18

Exons besteht und auf Chromosom 21 lokalisiert ist (Lamb et al., 1993). Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen dieses Proteins, von denen APP695 vor allem in Neuronen exprimiert wird, wohingegen an anderen Stellen im Körper hauptsächlich APP751 und APP770 vorkommen (Zhang et al., 2012). In der Haut ist die Expression von APP ebenfalls sehr hoch, wobei das Protein vor allem in der basalen Zellschicht der Epidermis vorhanden ist. Vor allem die Amyloid Precursor Protein Isoformen 751 und 770 werden in humanen Keratinozyten stark exprimiert (Hoffmann et al., 2000).

Die Prozessierung von APP erfolgt auf zwei verschiedene Weisen (Abbildung 6). Während der nicht amyloidogenen Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins durch die α -Sekretase entsteht kein Beta-Amyloid. Hierbei entstehen das neuroprotektive sAPP- α und das Fragment C83, welches durch die γ -Sekretase weiter in p3 und AICD (*APP intracellular domain*) gespalten wird, die beide schnell abgebaut werden (Pearson and Peers, 2006, Zhang et al., 2012). Die sekretorische N-terminale Domäne von APP (sAPP), die bei Spaltung durch die α -Sekretase entsteht, spielt in der Haut eine besondere Rolle, da sie die epitheliale Proliferation konzentrationsabhängig günstig beeinflusst (Hoffmann et al., 2000).

Beta-Amyloid entsteht nur bei amyloidogener Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins, wobei dieses zunächst durch die β -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase gespalten wird (Zhang et al., 2012). Als Nebenprodukte entstehen dabei sAPP- β und AICD (Pearson and Peers, 2006).

Beta-Amyloid kann in Form von extrazellulären Plaques aggregieren oder es kann durch verschiedene Enzyme, wie Neprilysin, *Insulin Degrading Enzyme* oder *Endothelin Converting Enzyme*, abgebaut werden (Pearson and Peers, 2006).

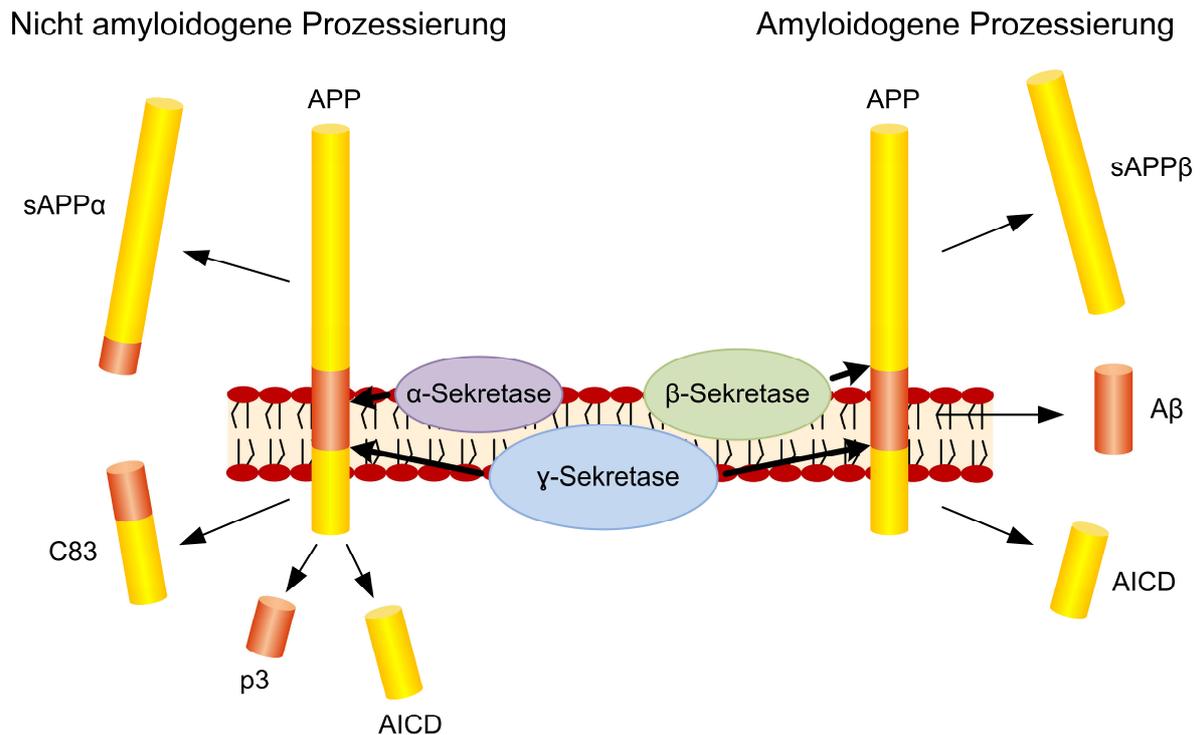


Abbildung 6: Prozessierung von Amyloid Precursor Protein.

Durch nicht amyloidogene Prozessierung von Amyloid Precursor Protein entsteht sAPPα und C83, wobei C83 weiter in p3 und AICD gespalten wird. Die amyloidogene Prozessierung führt zur Entstehung von Beta-Amyloid, sAPPβ und AICD (adaptiert nach Pearson and Peers, 2006).

1.4.4 Zusammenhang zwischen Beta-Amyloid-Struktur und dessen Toxizität

Im Zusammenhang mit der Alzheimer-Forschung wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, um die zellulären Mechanismen, die der Aβ-Neurotoxizität zugrunde liegen, zu erforschen. Aufgrund von mangelnder Reproduzierbarkeit von Experimenten mit chemisch äquivalentem Beta-Amyloid unter gleichen Versuchsbedingungen, hat man eine intrinsische Variabilität in dem neurotoxischen Potenzial von Aβ postuliert. In Untersuchungen mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wurde herausgefunden, dass die neurotoxische Aktivität von Beta-Amyloid mit zunehmendem Vorliegen einer β-Faltblattstruktur steigt. Eine *Random Coil* Konformation hingegen zeigte sich nur wenig toxisch. Geringe Änderungen in der Synthese, Purifikation oder Lyophilisierung des rekombinanten Peptids können bereits zu unterschiedlichen Konformationen führen, was sich daraufhin negativ auf die Versuchsergebnisse auswirken kann (Simmons et al., 1994). Des Weiteren kann Beta-Amyloid unter physiologischen Bedingungen zu löslichen Oligomeren oder sogar unlöslichen Fibrillen aggregieren (Abbildung 7). Bei Alzheimer sollen vor allem lösliche Oligomere zur Verschlechterung der kognitiven Funktion führen. Um in

Experimenten *in vitro* mit stabilen Formen von Beta-Amyloid zu arbeiten, haben Ryan et al. eine Methode gefunden, die es ermöglicht A β -Monomere, aber auch A β -Oligomere herzustellen (Ryan et al., 2010).

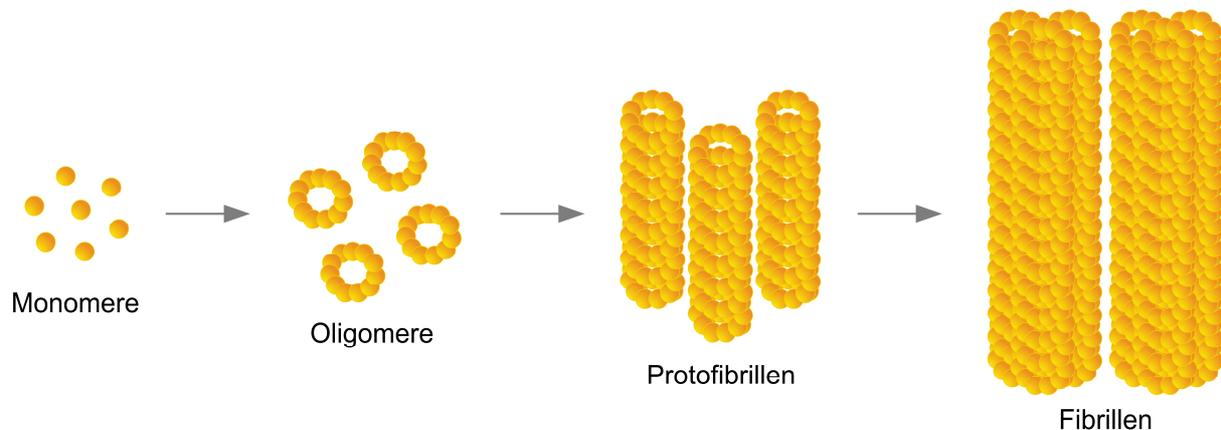


Abbildung 7: Schematische Skizze verschiedener Konformationen von Beta-Amyloid.

Konformationsänderung von A β_{42} von löslichen Monomeren über Oligomere zu Protofibrillen und schließlich unlöslichen Fibrillen (in Anlehnung an Ryan et al., 2010).

1.5 Acne inversa (Hidradenitis suppurativa)

1.5.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Acne inversa (AI) ist eine chronisch-rezidivierende, abszedierende, furunkelartige Entzündung, die im Gegensatz zur Acne conglobata nicht die Talgdrüsenfollikel, sondern die Terminalhaarfollikel betrifft (Moll, 2010, Rassner, 2007).

Die Prävalenz liegt zwischen 1 und 4 % (Sabat et al., 2012). Frauen sind etwa 2 – 5 mal häufiger betroffen als Männer (Jansen et al., 2001). Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen 25 und 45 Jahren (Hengge, 2006).

Zu Beginn der Erkrankung kommt es zu einer Hyperkeratose der Terminalhaarfollikel, sekundär werden die apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen einbezogen. Durch physiologische Hautkeime und *Staphylococcus aureus* kommt es zur Superinfektion (Moll, 2010). Man unterscheidet zwischen familiärer und sporadischer Acne inversa (Wang et al., 2010), wobei 35 – 40 % der Betroffenen eine positive Familienanamnese haben (Li et al., 2011). Nikotinabusus sowie Adipositas stellen Risikofaktoren dar (Hengge, 2006, Happle and König, 2011, Sabat et al., 2012).

1.5.2 Diagnostik und Einteilung

Für die Diagnosesicherung der Acne inversa müssen laut der 2nd *International Conference on Hidradenitis suppurativa* folgende drei Kriterien (Tabelle 2) erfüllt sein (Fimmel and Zouboulis, 2010):

1) Typische Läsionen, d.h. tief sitzende schmerzhafte Knoten: "unvollständig eiternde Furunkel" in frühen Läsionen; Abszesse, drainierende Sinus, Brückennarben und "Grabstein" doppel-seitige Pseudo-Komedonen in sekundären Läsionen
2) Typische Topographie, d.h. Axilla, Leiste, perineale und perianale Region, Gesäß, infra- und intermamilläre Falten
3) Chronizität und Rezidivität

Tabelle 2: Diagnostische Kriterien der Acne inversa.

Die Einteilung des Schweregrads erfolgt nach der Hurley-Klassifikation (Tabelle 3) (Gener et al., 2009):

Schweregrad	Charakteristik
Grad I	Abszess-Formation, einzeln oder multipel, ohne Fistelgänge und Vernarbung
Grad II	Rezidivierende Abszesse mit Fistelgang-Formation und Vernarbung; einzeln oder multipel, weit auseinander liegende Läsionen
Grad III	Diffuser oder flächiger Befall, oder multiple miteinander verbundene Fistelgänge und Abszesse über das gesamte Gebiet

Tabelle 3: Hurley-Klassifikation.

Von den Acne inversa Patienten sind etwa 65,6 – 76 % von Hurley-Stadium I betroffen, 20 – 27,4 % von Stadium II und 4 – 7 % von Stadium III (Jemec, 2006, Canoui-Poitaine et al., 2012).

1.5.3 Klinik und Therapie

Durch die Entzündung der Terminalhaardrüsen kommt es zu Abszess- und Fistelbildung sowie zur Bildung von wulstartigen, schmerzhaften, furunkuloiden Knoten, die sich zu fuchsbauartigen Gängen ausdehnen können. Bei Perforation der entzündeten Knoten kommt es zur Absonderung von eitrig-fötidem Sekret. Sekundär kann es durch die Bildung von Narbensträngen zur Bewegungseinschränkung kommen. Die Lokalisation ist intertriginös, vor allem axillär und inguinal. Männer haben eher anogenitale Läsionen, während die Lokalisation bei Frauen oft axillär ist. Während des akuten Schubs können allgemeines Krankheitsgefühl sowie Leukozytose und Temperaturanstieg vorkommen (Hengge, 2006, Jansen et al.,

2001, Plewig et al., 2012). Die Erkrankung geht mit einem hohen Leidensdruck der Patienten einher. Viele Betroffene leiden unter Depressionen (Vazquez et al., 2013). Acne inversa tritt gehäuft mit einigen anderen Krankheiten auf, wie beispielsweise mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa oder der Spondylarthropathie, allerdings ist eine Assoziation derzeit noch nicht bewiesen (Fimmel and Zouboulis, 2010, van der Zee et al., 2010).

Die Therapie von Acne inversa gestaltet sich oft schwierig und das Ergebnis ist häufig nicht zufriedenstellend. In frühen Stadien dieser Erkrankung kann versucht werden, lokal zu therapieren. Hierzu dienen Ichthyol, antiseptische Umschläge sowie topische Antibiotika und Kortikosteroide (Hengge, 2006, Jansen et al., 2001).

Bei ausgedehnten Befunden kann eine 10-wöchige systemische antibiotische Kombinationstherapie mit Clindamycin (600 mg täglich) und Rifampicin (600 mg täglich) Besserung verschaffen (Mendonca and Griffiths, 2006, Gener et al., 2009). Auch eine Therapie mit Infliximab (5 mg/kg Körpergewicht), einem monoklonalen Antikörper gegen Tumornekrosefaktor- α , ist wirkungsvoll (Grant et al., 2010). Allerdings ist die einzige Erfolg versprechende Therapie oft nur die großzügige chirurgische Exzision der betroffenen Hautregionen (Hengge, 2006, Plewig et al., 2012).

1.6 Mögliche Bedeutung von Beta-Amyloid bei Acne inversa

Die an der Bildung von Beta-Amyloid beteiligte γ -Sekretase ist eine Transmembranprotease, die die Spaltung von Typ 1 Transmembranproteinen vornimmt. Sie besteht aus vier Proteinuntereinheiten, von denen Presenilin die katalytische Untereinheit bildet und *Presenilin Enhancer 2* (PEN2), Nicastrin (NCT) sowie *Anterior Pharynx Defective 1* (APH1) als Kofaktor-Untereinheiten fungieren (Wang et al., 2010). Gao et al. identifizierten 2006 bei einer großen chinesischen Acne inversa Familie erstmals Chromosom 1p21.1 – 1q25.3 als Lokalisation für Acne inversa (Gao et al., 2006). Wang et al. untersuchten 2010 das Genom von sechs chinesischen Familien mit familiärer Acne inversa und entschlüsselten einen Genlokus für Acne inversa auf Chromosom 19q13. Sie entdeckten verschiedene Mutationen in den Protein-Untereinheiten der γ -Sekretase, die zum Teil einen kompletten Verlust der Funktion der γ -Sekretase zur Folge haben. Dabei reicht eine

Haploinsuffizienz bereits aus. Die molekulare Pathogenese von Acne inversa soll der γ -Sekretase-Notch Signalweg sein (Wang et al., 2010).

Auch Pink et al. und Liu et al. beschreiben jeweils zwei Mutationen in den Untereinheiten der γ -Sekretase, die bei Acne inversa Patienten, jedoch nicht bei den gesunden Kontrollen vorkommen (Pink et al., 2011, Liu et al., 2011b).

Kelleher III et al. betrachten die γ -Sekretase im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen und gehen dabei vor allem auf Alzheimer, aber auch Acne inversa ein. Sie führen auf, dass eine Haploinsuffizienz der Gene der Untereinheiten der γ -Sekretase zu einer reduzierten γ -Sekretase-Aktivität und einem verminderten Notch-Signalweg führt und letztendlich das Krankheitsbild der Acne inversa entsteht. Des Weiteren vermuten sie, dass ein partieller Verlust der Presenilin-Funktion eine Überproduktion von längeren Beta-Amyloid-Fragmenten zur Folge hat (Kelleher and Shen, 2011). Auch die bei Alzheimer entdeckten Mutationen im Presenilin-Gen führen zur Ablagerung von längeren A β -Arten, nämlich A β ₄₂ und A β ₄₃ (Vardy et al., 2005).

Da Amyloid Precursor Protein auch in der Haut exprimiert wird (s. 1.4.3), könnte es also bei einer γ -Sekretase-Mutation bei Acne inversa zur Ablagerung längerer Beta-Amyloid-Fragmente, darunter A β ₄₂, in der Haut kommen.

Van der Zee et al. untersuchten 2011 die Expression verschiedener Zytokine in läsionalen Hautproben von Acne inversa Patienten. Darin waren im Vergleich zu gesunder Kontrollhaut erhöhte Spiegel an IL-1 β , Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-10 messbar. Die Autoren gehen davon aus, dass das biologisch aktive IL-1 β über Inflammasome gebildet wird (van der Zee et al., 2011).

1.7 Ziel der vorliegenden Untersuchung

Wie unter 1.6 beschrieben, wurden bei Acne inversa verschiedene Mutationen in der γ -Sekretase entdeckt. Diese Protease ist durch Spaltung von Amyloid Precursor Protein maßgeblich am Entstehungsprozess von Beta-Amyloid beteiligt. Ein Defekt der γ -Sekretase führt folglich zu einer fehlerhaften Synthese dieses Peptids.

Beta-Amyloid ist vor allem durch die Alzheimer-Forschung sehr gut untersucht. Auch bei dieser Erkrankung sind Mutationen in γ -Sekretase-Untereinheiten bekannt. Diese führen zum einen zur Produktion größerer Mengen Amyloid β (Cappellano et al.,

2013) und zum anderen zur Ablagerung längerer Beta-Amyloid-Arten im Gehirn, nämlich $A\beta_{42}$ und $A\beta_{43}$ (Vardy et al., 2005).

Bei Acne inversa könnte es durch die Mutation im Gen der γ -Sekretase also ebenfalls zu einer Überproduktion von längeren Beta-Amyloid-Fragmenten kommen (Kelleher and Shen, 2011) und da Amyloid Precursor Protein auch in der Haut exprimiert wird (s. 1.4.3), könnte dies eine Ablagerung von $A\beta_{42}$ und $A\beta_{43}$ in der Haut zur Folge haben.

Um diese Hypothese zu überprüfen, soll im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob Beta-Amyloid in läsionaler Haut von Acne inversa Patienten nachzuweisen ist.

Des Weiteren soll ermittelt werden, ob die Stimulation von primären Keratinozyten mit exogenem Beta-Amyloid 1-42 *in vitro* zu einer inflammatorischen Reaktion führt, welche charakteristisch für Acne inversa ist. Da Interleukin-1 β als proinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt und zudem in Hautproben von Acne inversa Patienten erhöhte Spiegel an IL-1 β gemessen wurden (s. 1.6), soll nach Stimulation der primären Keratinozyten mit exogenem $A\beta_{42}$ die IL-1 β -Sekretion gemessen werden.

In der Alzheimer-Forschung ist der Mechanismus, der durch Stimulation von Mikrogliazellen zur Interleukin-1 β -Sekretion führt, bereits genauer untersucht worden. Dabei hat sich herausgestellt, dass fibrilläre β -Amyloid Peptide in neuronalen Zellen zu einer Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms führen (Halle et al., 2008). Aber auch Toll-like Rezeptor 2 ist für die IL-1 β -Produktion verantwortlich (Liu et al., 2011a).

Sofern die Stimulation der Keratinozyten mit Beta-Amyloid ebenfalls zu einer IL-1 β -Freisetzung führt, soll weiterhin erforscht werden, über welchen Mechanismus diese Inflammation hervorgerufen wird.

Hierbei liegt der Fokus, in Anlehnung an die Ergebnisse der Alzheimer-Forschung, vor allem auf der Rolle des Inflammasoms NLRP3 sowie des Toll-like Rezeptors 2.

2 Material und Methoden

2.1 Primäre humane epidermale Keratinozyten (HEKn)

In dieser Arbeit wurde mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (*Human Epidermal Keratinocytes, neonatal* (HEKn), Cascade Biologics) gearbeitet.

Die primären Keratinozyten wurden im Brutschrank (HERAcell 150i, Heraeus instruments) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) in GIBCO EpiLife[®] Zellkulturmedium mit 60 µM Calciumchlorid kultiviert. Dem Medium wurde zuvor zusätzlich 1 x EpiLife[®] *defined growth supplement* (EDGS) und 10 µg/ml Gentamycin sowie 0,25 µg/ml Amphotericin B (alle Reagenzien von Cascade Biologics) beigemischt. Die primären Keratinozyten wurden bis zu Passage drei kultiviert.

Die Zellkulturarbeit wurde an einer Sterilwerkbank (HERAsafe, Heraeus instruments) durchgeführt. Vor und nach der Arbeit wurde diese desinfiziert, ebenso wie alle Materialien, mit denen gearbeitet wurde.

Alle Lösungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, vor Benutzung wurden sie bis auf Raumtemperatur erwärmt.

Vor der Kultivierung von HEKn mussten die Kulturgefäße mit einer Coating-Matrix (Cascade Biologics) beschichtet werden. Dazu wurde die Coating-Matrix in *Dilution Medium* im Verhältnis 1:100 verdünnt und für 30 Minuten im entsprechenden Kulturgefäß inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die primären Keratinozyten konnten in das Gefäß ausgesät werden.

Zum Auftauen der Keratinozyten wurden die in Kryoröhrchen im Stickstofftank aufbewahrten Zellen 1 Minute im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Keratinozyten in eine zuvor mit 10 ml Medium gefüllte 75 cm²-Flasche ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte stets ein Mediumwechsel, um das für die Zellen toxische Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen.

Zum Splitten der Keratinozyten wurde zunächst das Medium aus der 75 cm²-Flasche abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml 1 x *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA) für HEK_n (0,025 % Recombinant Trypsin, 0,01 % EDTA, Cascade Biologics) wurden die Zellen für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde unter dem Mikroskop die Ablösung der Zellen beurteilt. Falls die Zellen sich vom Boden gelöst hatten, wurden rasch 2 ml Trypsin-Neutralizer (0,5 % *Newborn Bovine Serum*, Cascade Biologics) sowie 8 ml EpiLife[®] Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde nun mehrmals resuspendiert und anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde bei 900 U/min 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und es wurden 10 ml EpiLife[®] Medium auf das Zellpellet gegeben. Die Zellsuspension wurde mehrmals vorsichtig resuspendiert und dann entsprechend auf die Kulturgefäße, in welche bereits Medium vorgelegt wurde, verteilt. Diese wurden dann im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2 Stimulation der primären Keratinozyten mit Beta-Amyloid 1-42

Die primären Keratinozyten wurden vor der Stimulation mit Beta-Amyloid 1-42 (Innovagen) stets in 12- bzw. 24-*well*-Platten ausgesät und zunächst für mindestens einen Tag darin kultiviert. Dann wurden die Zellen mit Beta-Amyloid 1-42 in einer Konzentration von 20 µM (90,28 µg/ml) bzw. 40 µM (180,56 µg/ml) (Stock: 1 mg/ml) stimuliert und für zwei Stunden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Danach erfolgte die Abnahme des Mediums, welches bis zur Durchführung des IL-1β-ELISAs bei – 20 °C eingefroren wurde.

2.3 Herstellung von Beta-Amyloid-Monomeren

Da verschiedene Aufbereitungsmethoden von Amyloid β zu Unterschieden in der Stabilität und somit auch der Reproduzierbarkeit der Experimente führen können, wurde Beta-Amyloid 1-42 (Innovagen) in den Versuchen, in denen der Mechanismus der Zytokinsekretion untersucht wurde, speziell aufbereitet, um stabile Monomere

herzustellen (Ryan et al., 2010). Direkt vor der Anwendung von Beta-Amyloid in den Stimulationsversuchen wurde das A β ₄₂-Peptid in DMSO auf eine Konzentration von 5 mM resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Behandlung im Ultraschallwasserbad wurde die Lösung weiter auf 50 μ g/ml in PBS verdünnt. Nach kurzem Vortexen konnte das Amyloid β direkt in den Versuchen angewendet werden.

2.4 Analyse der Zellsignalwege durch Transfektion mit siRNA

siRNAs (*short interfering RNA*) sind kurze RNA-Sequenzen, die durch komplementäre Bindung an für sie spezifische mRNA-Sequenzen in der Zelle die Translation dieser RNA-Sequenzen blockieren können. In Folge dessen wird die Proteinexpression bestimmter Gene in der Zelle herunterreguliert.

Für die Transfektion mit der siRNA wurde bei einem Endvolumen von 500 μ l pro *well* zunächst ein Ansatz B mit 41,6 μ l Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen) und 0,416 μ l Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen) angesetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde ein Ansatz A mit 41,6 μ l Opti-MEM Reduced Serum Medium und 0,5 μ l der entsprechenden siRNA (20 μ M) vorbereitet. Nach der fünfminütigen Inkubationszeit wurde der komplette Ansatz B in den Ansatz A überführt und es erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden 416 μ l EpiLife[®] Medium in das *well* mit den Zellen vorgelegt und anschließend wurden 84 μ l des Ansatzes hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 48 Stunden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit).

In dieser Arbeit erfolgte die Transfektion mit folgenden siRNAs (Tabelle 4):

siRNA	Sequenz 5' -> 3'
CO3-siRNA	GCG CAU UCC AGC UUA CGU AUU TT
AIM2-siRNA	GAA ACG AGG ACA CAA UGA ATT
NLRP3-siRNA	CAA CAG GAG AGA CCU UUA U
ASC-siRNA	CCG CCG AGG AGC UCA AGA ATT
Caspase-1-siRNA	GAA GAC UCA UUG AAC AUA UTT
TLR2-siRNA	GGG CAG UCU UGA ACA UUU A

Tabelle 4: Sequenzen der zur Transfektion verwendeten siRNAs.

2.5 Analyse der Zellsignalwege durch Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen

Zur Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wurde Ilomastat (Biomol) verwendet, das humane MMP-1, -2, -3, -8 und -9 inhibiert. Zunächst wurden die Zellen in 12- bzw. 24-*well*-Platten ausgesät und für mindestens einen Tag darin kultiviert. Dann wurden die Zellen für 24 Stunden in 10 μM (3,8847 $\mu\text{g/ml}$) bzw. 25 μM (9,71175 $\mu\text{g/ml}$) Ilomastat inkubiert, um anschließend eine Stimulation mit Beta-Amyloid durchzuführen.

2.6 RNA-Isolation

Durch Isolation der RNA und anschließende cDNA-Synthese sowie Real-Time PCR kann die Genexpression in den Zellen untersucht werden. So kann festgestellt werden, ob bestimmte Gene nach Stimulation bzw. Behandlung der Zellen mit bestimmten Stoffen hoch- bzw. herunterreguliert werden.

Die RNA-Isolation erfolgte mittels TRIzol[®] *Reagent* (Invitrogen), welches unter anderem Phenol und Guanidin Isothiozyanat enthält. Es hemmt die RNasen-Aktivität und zerstört gleichzeitig die Zellen und bringt die Zellkomponenten in Lösung.

Die RNA-Isolation wurde nach Protokoll von Invitrogen durchgeführt und unterteilt sich in mehrere Phasen.

2.6.1 Homogenisierung

Zu Beginn der RNA-Isolation aus einer 12-*well*-Platte wurde je 1 ml TRIzol[®] *Reagent* in jedes *well* gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem Auf- und Abpipettieren wurde die nun homogene Lösung aus jedem *well* in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

2.6.2 Phasentrennung

Um die RNA von den restlichen Bestandteilen dieser Lösung zu trennen, wurden zunächst 0,2 ml Chloroform zu jedem Ansatz hinzugegeben. Die geschlossenen Reaktionsgefäße wurden etwa 15 Sekunden per Hand geschüttelt und nach einer

dreiminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur zentrifugiert (12000 g, 15 min, 4 °C). Nach dem Zentrifugieren wurden folgende Phasen sichtbar (Abbildung 8):

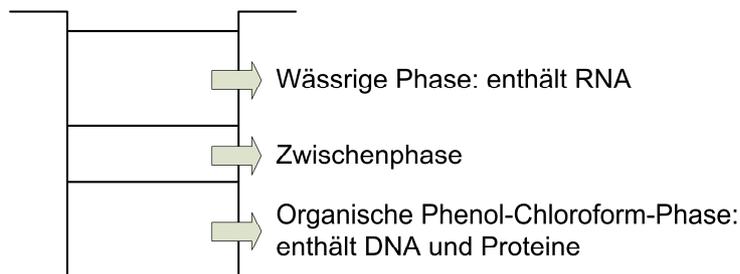


Abbildung 8: Phasentrennung zur RNA-Isolation.

Zur Isolation der RNA aus primären Keratinozyten werden die Zellen in TRIzol® Reagent und Chloroform gelöst und durch Zentrifugation wird die Lösung in drei Phasen aufgetrennt, wobei die oberste Phase RNA enthält.

2.6.3 RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wurde jeweils in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro Gefäß wurde die Lösung per Hand geschüttelt und danach für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (12000 g, 10 min, 4 °C), wobei sich das RNA-Pellet am Boden des Gefäßes ablagerte.

2.6.4 Waschen der RNA

Der Überstand wurde abgenommen und pro Gefäß wurde 1 ml 75 %-Ethanol hinzugegeben und gevortext. Danach wurde erneut zentrifugiert (7500 g, 5 min, 4 °C).

2.6.5 Neuauflösung der RNA

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und die Eppendorf Reaktionsgefäße wurden umgedreht auf ein Tuch gestellt, damit die RNA für etwa 15 Minuten trocknen konnte. Anschließend wurden 25 µl RNase-freies Wasser in jedes Gefäß gegeben und nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren konnten die Proben bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden.

2.7 cDNA-Synthese

Für die anschließende Real-Time PCR müssen die RNA-Proben zunächst mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

Hierzu wurde das Thermo Scientific DyNAmo cDNA Synthesis Kit der Firma Finnzymes verwendet. Für eine Reaktion wurden 10 µl *RT-Buffer (2x)*, 1 µl *Random Hexamer Primer*, 2 µl Reverse Transkriptase und 7 µl RNA benötigt. Zunächst wurde für alle Reaktionen ein Master-Mix aus *RT-Buffer*, *Random Hexamer Primer* und Reverser Transkriptase in einem Gefäß angesetzt. Anschließend wurden je 13 µl des Master-Mixes in die PCR-Röhrchen überführt und je 7 µl RNA-Probe hinzugegeben. Die PCR-Röhrchen wurden nun in den Cycler (Veriti, Applied Biosystems) eingesetzt und es erfolgte die *Primer-Elongation* (25 °C, 10 min), die cDNA-Synthese (37 °C, 30 min), die Reaktionsbeendigung zum Aufschmelzen der Doppelstränge (85 °C, 5 min) und zuletzt das Kühlen der Probe auf 4 °C.

Nach dem Lauf konnten die Proben bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C eingefroren werden.

2.8 Semi-quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der semi-quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion können DNA-Proben auf ihre Genexpression hin untersucht werden. Um ein bestimmtes Zielgen in der Probe zu untersuchen, benötigt man die fluoreszenzmarkierte Probe des Zielgens sowie dessen *forward* und *reverse Primer*. Als Kontrolle dient das *Housekeeping Gen* PBGD, das in einem weiten Spektrum an Zellen relativ unbeeinflusst von Umgebungsfaktoren konstant exprimiert wird.

Zunächst wurde ein Master-Mix des zu untersuchenden Gens für alle Proben angesetzt. Pro Ansatz bestand dieser aus 0,1 µl Probe PBGD (Roche), 0,1 µl *Primer* PBGD (Eurofins MWG Operon), 0,1 µl Probe des zu untersuchenden Gens (Universal Probe Library, Roche), je 0,2 µl *Primer forward* und *reverse* des zu untersuchenden Gens (Eurofins MWG Operon), 2,0 µl mit Enzym versetztem Reaktionsmix (LightCycler Taqman Master Kit, Roche), welcher alle notwendigen Nukleotide enthielt, sowie 4,3 µl bidestilliertem Wasser.

Da die Probe des zu untersuchenden Gens mit FAM-Fluorophor und die Probe PBGD mit Yellow 555 Fluorophor gekoppelt ist und es sich somit um zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe handelt, konnte die Genexpression dieser beiden Gene in einem dualen Ansatz gleichzeitig gemessen werden und anschließend direkt in Relation zueinander gesetzt werden.

Anschließend wurden je 7 μ l des Master-Mixes in die LightCycler Kapillaren für die PCR überführt und jeweils 3 μ l der zu untersuchenden cDNA-Probe hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente bidestilliertes Wasser an Stelle der cDNA. Nach kurzer Zentrifugation (1000 U/min, 30 s, 4 °C) erfolgte die Real-Time PCR durch das LightCycler 2.0 System (Roche).

Hierbei erfolgte zunächst eine Präinkubation (95 °C, 10 min) und danach die aus 50 Zyklen bestehende Quantifikation mit folgenden Schritten (Abbildung 9):

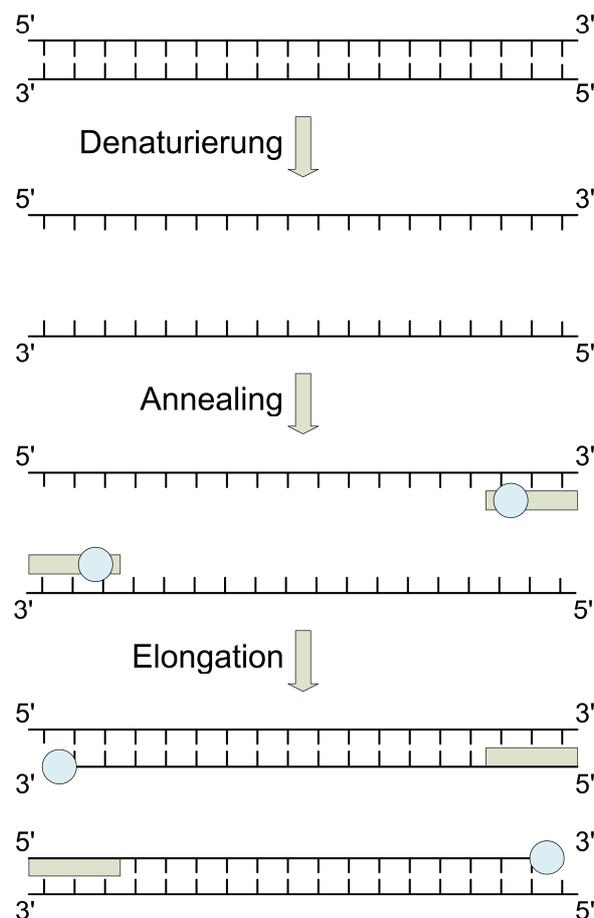


Abbildung 9: Polymerase-Kettenreaktion.

Zur Auftrennung der DNA in zwei Einzelstränge werden die Proben zunächst auf 95 °C erhitzt, bei 60 °C erfolgen die Primerhybridisierung und schließlich die Elongation durch eine hitzestabile Polymerase.

2.8.1 Denaturierung

Denaturierung bezeichnet die Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA, so dass sie in 2 Einzelsträngen vorliegt. Dazu wurde die DNA 10 Sekunden lang auf 95 °C erhitzt.

2.8.2 Primerhybridisierung

Dieser Schritt wird auch als *Annealing* bezeichnet und besteht aus der spezifischen Anlagerung der zwei *Primer* an ihren jeweils komplementären DNA-Strang. So werden Start- und Endpunkt der Replikation für die Polymerase markiert. Dieser Vorgang erfolgte 30 Sekunden lang bei 60 °C.

Folgende *Primer* wurden verwendet (Tabelle 5):

Gen	Primer forward (5' -> 3')	Primer reverse (5' -> 3')
Pro-IL-1 β	CTG TCC TGC GTG TTG AAA GA	TTG GGT AAT TTT TGG GAT CTA CA
IL-8	AGA CAG CAG AGC ACA CAA GC	ATG GTT CCT TCC GGT GGT
TNF- α	CAC CCA GCC TTT CCT GAG	GCC TGT GTT TGG GTC CTG
IFN- α	TGA TGA ATG CGG ACT CCA	TCT GTC AGA TAG AGA GTG ATT CTT CG
IFN- β	CTG GCT GGA ATG AGA CTA TTG TT	CAG GAC TGT CTT CAG ATG GTT TAT C
IFN- γ	TGC TCA GCT TTC ACT ATT GCT G	TTT CTG GGG GCT TAC ATG AG

Tabelle 5: Sequenzen der zur semi-quantitativen Real-Time PCR verwendeten Primer.

2.8.3 Elongation

Hier findet die eigentliche Amplifizierung der DNA statt. Dabei wird durch Einbau von verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) durch die hitzestabile Polymerase jeweils ein zu den beiden DNA-Strängen komplementärer Strang synthetisiert. Dieser Vorgang dauerte eine Sekunde bei 60 °C.

Nach den 50 Zyklen der Amplifizierung erfolgte zuletzt eine Abkühlungsphase (40 °C, 30 s).

Bei dieser Real-Time PCR wurden für die Detektion eines Fluoreszenzsignals Taqman-Sonden verwendet. Dies sind Sonden, die an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten, am anderen Ende einen Quencher. Durch den Quencher wird das Fluoreszenzsignal zunächst unterdrückt. Durch die Taq-

Polymerase, die auch eine 5'-3'-Exonukleasereaktivität besitzt, werden während der Elongation Fluorophor und Quencher abgespalten und so kann ein Signal ausgehend vom Fluorophor gemessen werden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt nach der $\Delta\Delta\text{-C}_T$ -Methode. Hierbei erfolgt eine relative Quantifikation der Genexpression des Zielgens relativ zu einer Referenzgruppe, was meist eine unbehandelte Probe darstellt (Livak and Schmittgen, 2001).

2.9 Interleukin-1 β -Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IL-1 β -ELISA)

Nach Stimulation der primären Keratinozyten mit Beta-Amyloid wurde nach Ablauf der Inkubationszeit der Überstand aus jedem einzelnen *well* der 12- bzw. 24-*well*-Platte abgenommen und jeweils in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden dann bei 2000 U/min drei Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand davon wurde erneut in je ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Durchführung des IL-1 β -ELISAs eingefroren.

Zur Bestimmung der Quantität der IL-1 β -Ausschüttung bei Stimulation der Keratinozyten mit β -Amyloid wurde ein IL-1 β -ELISA (R&D Systems) durchgeführt. Dazu wird ein so genannter *Double-Antibody-Sandwich-ELISA* verwendet, wobei die IL-1 β -Moleküle zwischen zwei Antikörpern detektiert werden und über eine enzymatisch vermittelte Farbreaktion mittels Spektrometer quantifiziert werden können (Abbildung 10).

Zunächst wurden die für die Messung benötigten *wells* der 96-*well*-Platte mit einem *Capture-Antibody* gecoatet. Dieser wurde mit PBS auf eine Arbeitskonzentration von $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt und von dieser Lösung wurden jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ in jedes *well* der Platte gegeben. Diese wurde dann mit Parafilm verschlossen und über Nacht lichtgeschützt inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst ein dreimaliger Waschvorgang mit jeweils $200\text{ }\mu\text{l}$ PBS-T (PBS mit 0,05 % Tween 20) pro *well*, bevor dann $300\text{ }\mu\text{l}$ *Reagent Diluent* (PBS mit 1 % BSA, sterilfiltriert) pro *well* aufgetragen wurden, um die Stellen am Boden des *wells* zu blocken, an denen kein *Capture-*

Antibody gebunden hat. Die Platte wurde erneut mit Parafilm verschlossen und es erfolgte eine einstündige Inkubation. Danach erfolgte erneut ein Waschvorgang wie oben beschrieben. Als nächstes wurden die Standardkonzentrationsreihe und die Proben aufgetragen. Zuvor wurde dazu der IL-1 β -Standard in *Reagent Diluent* verdünnt. Die Stock-Konzentration betrug 100 ng/ml, die einzelnen Arbeitskonzentrationen sollten S1 = 200 pg/ml, S2 = 100 pg/ml, S3 = 50 pg/ml, S4 = 25 pg/ml, S5 = 12,5 pg/ml, S6 = 6,25 pg/ml, S7 = 3,125 pg/ml und S8 = 0 pg/ml (*Blank* = *Reagent Diluent*) betragen. Von jeder Standardkonzentration wurden 100 μ l in ein *well* gefüllt, in die übrigen *wells* erfolgte die Gabe von je 100 μ l Probenmaterial. Die mit Parafilm verschlossene Platte wurde zwei Stunden lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte der nächste Waschvorgang. Dann wurde der *Detection-Antibody* entsprechend in *Reagent Diluent* verdünnt, dass die Arbeitskonzentration 300 ng/ml betrug. Von dieser Lösung wurden erneut je 100 μ l in jedes *well* gegeben, die Platte musste für zwei Stunden lichtgeschützt und mit Parafilm versiegelt inkubiert werden. Es erfolgte erneut ein Waschvorgang. Dann wurden jeweils 100 μ l von 1:200 in *Reagent Diluent* verdünntem Streptavidin-HRP in jedes *well* gefüllt. Es erfolgte eine 30-minütige lichtgeschützte Inkubation der mit Parafilm verschlossenen Platte. Danach erfolgte der letzte Waschvorgang. Nun wurden je 100 μ l TMB-Lösung (10 ml TMB-Solution + 2 μ l H₂O₂) in jedes *well* gegeben (TMB-Solution: 5 ml TMB (42 mM TMB in DMSO) in 500 ml Natrium-Acetat-Puffer pH 5,2). Dieses Substrat bewirkte je nach IL-1 β -Gehalt einen unterschiedlich intensiven Farbumschlag nach blau. Die Inkubationszeit betrug erneut 30 Minuten. Abschließend wurden in jedes *well* 50 μ l H₂SO₄ hinzugegeben, was die durch die TMB-Lösung hervorgerufene Reaktion stoppte und einen erneuten Farbumschlag nach gelb verursachte.

Innerhalb von 20 Minuten erfolgte nun die Messung am Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm.

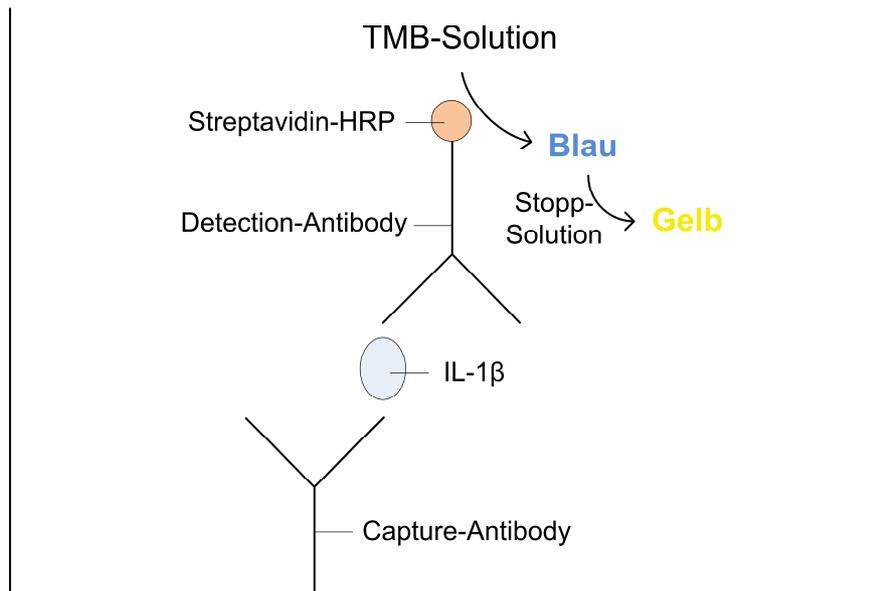


Abbildung 10: IL-1 β -ELISA.

Interleukin-1 β wird zwischen *Capture-* und *Detection-Antibody* gebunden und durch Zugabe von HRP-gekoppeltem Streptavidin kann ein von der Menge des IL-1 β abhängiger Farbumschlag der zunächst farblosen TMB-Lösung nach blau stattfinden. Diese Reaktion wird durch Zugabe von H₂SO₄ gestoppt, was einen weiteren Farbumschlag nach gelb verursacht. Die Intensivität des Farbumschlags ist proportional zur Menge an IL-1 β , welche relativ zu einer Standardkonzentrationsreihe quantifiziert werden kann.

2.10 Interleukin-18-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IL-18-ELISA)

Zur Bestimmung der Quantität der IL-18-Ausschüttung nach Stimulation der Keratinozyten mit Beta-Amyloid 1-42 wurde ein IL-18-ELISA (Human IL-18 ELISA Kit, MBL) verwendet. Wie bei dem IL-1 β -ELISA wurde ein *Double-Antibody-Sandwich-ELISA* durchgeführt, wobei diesmal schon vorgecoatete Platten dafür verwendet wurden. Die Proben wurden, wie unter 2.9 aufgeführt, vorbereitet und bei – 20 °C aufbewahrt.

Bei der Durchführung des ELISAs konnte direkt mit der Herstellung der Standards begonnen werden. Hierzu wurde die Stock Solution des Standards (2500 pg/ml) zur Herstellung der unterschiedlichen Standardkonzentrationen entsprechend mit *Assay Diluent* verdünnt. Die Arbeitskonzentrationen der Standards sollten S1 = 1000 pg/ml, S2 = 400 pg/ml, S3 = 160 pg/ml, S4 = 64 pg/ml, S5 = 25,6 pg/ml und S6 = 0 pg/ml (*Blank = Assay Diluent*) betragen. Anschließend wurden je 100 μ l der Standards in die *wells* der vorgecoateten 96-*well*-Platte gegeben und je 100 μ l der zu messenden Proben aufgetragen. Die Platte wurde zunächst mit Parafilm verschlossen und eine

Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit je 200 μl 1 x Waschpuffer pro *well* gewaschen. Anschließend wurden je 100 μl von 1:101 in *Conjugate Diluent* verdünntem *Peroxidase conjugated anti-human-IL-18-Antibody* in die *wells* pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 200 μl 1 x Waschpuffer pro *well* wurden je 100 μl Substrat-Solution (*TMB ready-to-use*) pro *well* aufgetragen und es erfolgte eine 30-minütige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden je 100 μl Stopp-Solution pro *well* hinzupipettiert und anschließend konnte die Absorption im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen werden.

2.11 Interferon- β -Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IFN- β -ELISA)

Um die Quantität der IFN- β -Sekretion der Keratinozyten nach Stimulation mit Beta-Amyloid zu bestimmen, wurde ein IFN- β -ELISA (VeriKine™ Human IFN- β ELISA Kit, PBL Interferon Source) verwendet. Wie bei dem IL-18-ELISA handelte es sich um einen *Double-Antibody-Sandwich-ELISA* mit schon vorgecoateten Platten. Die Proben wurden, wie unter 2.9 aufgeführt, vorbereitet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die Durchführung des ELISAs begann direkt mit der Herstellung der Standards. Die Stock Lösung des Standards (100.000 pg/ml) wurde entsprechend mit *Sample Diluent* verdünnt, um die Arbeitskonzentrationen S1 = 4000 pg/ml, S2 = 2000 pg/ml, S3 = 1000 pg/ml, S4 = 400 pg/ml, S5 = 200 pg/ml, S6 = 100 pg/ml, S7 = 50 pg/ml und S8 = 0 pg/ml (*Blank = Sample Diluent*) zu erhalten. Dann wurden je 50 μl *Sample Diluent* in alle benötigten vorgecoateten *wells* der 96-*well*-Platte gegeben und je 50 μl der Standards und der zu messenden Proben zu den 50 μl *Sample Diluent* hinzupipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und lichtgeschützt eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit je 200 μl des im Kit enthaltenen Waschpuffers pro *well* gewaschen. Daraufhin wurden je 100 μl des 1:100 in *Concentrate Diluent* verdünnten Antikörpers in die *wells* gegeben. Nach einstündiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut ein dreimaliger Waschvorgang. Anschließend wurden je 100 $\mu\text{l/well}$ der 0,65:100 in *Concentrate Diluent* verdünnten HRP-Lösung aufgetragen und es erfolgte eine einstündige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Nach

dreimaligem Waschen wurden nun je 100 µl des TMB Substrats in die *wells* gegeben und nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden je 100 µl Stopp-Solution hinzupipettiert. Direkt im Anschluss konnte die Absorption im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden.

2.12 Zytotoxizitäts-Assays

Um zu überprüfen, ob Beta-Amyloid toxisch für primäre Keratinozyten ist, wurden mehrere Zytotoxizitätstests durchgeführt.

2.12.1 WST-1-Assay

WST-1 (*water soluble tetrazolium*) ist ein schwach rot gefärbtes Tetrazoliumsalz, das von intakten Zellen durch die aktive mitochondriale Atmungskette in das dunkelrote Formazan verstoffwechselt wird. Der Farbumschlag kann im Spektrometer gemessen werden und ist proportional zur Zellproliferation.

Für den Proliferationstest wurde das *Cell Proliferation Reagent WST-1* von Roche verwendet. Die Anwendung erfolgte nach zweistündiger Stimulation mit Beta-Amyloid 1-42.

Nachdem das Medium zusammen mit dem Amyloid abgenommen wurde, wurden die Zellen mit 1 x PBS gespült. Anschließend wurden bei einer 12-*well*-Platte 300 µl EpiLife[®] Medium und 30 µl WST-1-Reagenz pro *well* auf die Zellen gegeben. Als *Blank* dienten zwei mit WST-1-Reagenz gefüllte *wells* ohne Zellen, um die Absorption des Mediums zusammen mit dem WST-1-Reagenz in Abwesenheit von Zellen zu messen. Sofort nach Füllen der *wells* mit dem Reagenz wurde am Spektrometer die Absorption bei 450 nm gemessen, wobei der gemessene OD-Wert als Nullwert diente. Danach wurde alle 30 Minuten erneut die Absorption gemessen, bis sich schließlich der OD-Wert nicht mehr deutlich veränderte, was etwa nach zwei Stunden der Fall war. Danach konnten die entsprechenden OD-Werte abzüglich der Nullwerte errechnet werden und in Bezug zu den OD-Werten der Negativkontrolle, also den nicht mit Beta-Amyloid 1-42 behandelten Zellen, gesetzt werden. So konnten Aussagen über die Viabilität der Zellen nach Stimulation mit Beta-Amyloid 1-42 gemacht werden.

2.12.2 Kristallviolett-Assay

Kristallviolett ist ein Farbstoff, der in lebende Zellen eindringt und dort DNA-assoziierte Nukleoproteine anfärbt. Bereits abgestorbene Zellen werden während der Prozedur gewegewaschen. Durch die colorimetrische Messung kann also eine Aussage über die Zellmasse und damit die Viabilität in Abhängigkeit verschiedener Faktoren gemacht werden.

Die zuvor mit A β ₄₂ behandelten Zellen wurden vor Zugabe des Kristallvioletts mit 1 x PBS gewaschen. Daraufhin wurden 300 μ l Kristallviolett (0,5 % Kristallviolett in 20 % Methanol) in jedes *well* gegeben. Die Platte wurde auf dem Schüttler (IKA-Schüttler MTS4, Staufen) 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgeschüttet und die Platte wurde mit Leitungswasser gespült, bis sich keine violette Farbe mehr löste. Über Nacht wurde die Platte umgedreht und lichtgeschützt getrocknet. Am nächsten Tag wurden 300 μ l Entwicklungslösung (0,1 M Na-Citrat in 50 % Ethanol) in die *wells* gegeben, die am Tag zuvor mit Kristallviolett behandelt wurden. Die Platte wurde für 10 Minuten auf dem Schüttler geschüttelt. Dann konnte die Absorption bei 550 nm am Photometer gemessen werden.

Wie bei dem WST-1-Assay wurden die gemessenen OD-Werte der mit Beta-Amyloid behandelten Zellen zu den OD-Werten der Negativkontrolle in Bezug gesetzt und so konnten Aussagen über die Viabilität der Zellen gemacht werden.

2.12.3 BrdU-Assay

Bei diesem Assay wird das Pyrimidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) an Stelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Das BrdU kann dann durch einen Antikörper mittels ELISA detektiert werden. Die Absorption ist proportional zur DNA-Synthese und somit zur Anzahl proliferierender Zellen.

Für diesen Test wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche) verwendet. Zunächst wurde das *BrdU labeling reagent* 1:100 mit EpiLife[®] Medium verdünnt. Pro *well* wurden mit dem Medium zusätzlich 10 % des Mediumvolumens von dem verdünnten *BrdU labeling reagent* direkt mit der Zugabe der zu testenden Substanz, in diesem Fall Beta-Amyloid, auf die Zellen gegeben. Als *Blank* diente *BrdU labeling reagent* ohne Zellen, als Negativkontrolle nicht mit Beta-Amyloid

behandelte Zellen. Die Platte wurde für 24 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Danach wurde der Überstand abgesaugt und pro *well* wurden 300 µl FixDenat auf die Zellen gegeben, welches für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach dem Abkippen der Flüssigkeit wurden 300 µl von 1:100 in *Antibody Dilution Solution* verdünntem Anti-BrdU-POD in jedes *well* gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgekippt und pro *well* wurde dreimal mit 300 µl 1:10 in destilliertem Wasser verdünntem *Washing Buffer* gewaschen. Nun wurden 300 µl Substrat-Solution in jedes *well* gegeben und als der Farbumschlag deutlich zu sehen war, was etwa nach 30 Minuten der Fall war, konnte die Absorption bei 370 nm (Referenz 492 nm) im Spektrometer gemessen werden.

Auch hier wurden zunächst die OD-Werte des *Blank* abgezogen, um dann die OD-Werte auf die der Negativkontrolle zu beziehen und so eine Aussage über die Toxizität des Amyloids machen zu können.

2.13 Immunhistochemie

Zum Nachweis von Beta-Amyloid wurden Paraffinschnitte von Patienten mit Acne inversa immunhistochemisch gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst durch zweimalige Inkubation für 10 Minuten in Xylol und jeweils fünfminütige Inkubation in 100 %, 96 %, 80 % und 70 % Isopropanol entparaffiniert. Nach kurzer Inkubation in destilliertem Wasser wurden die Proben zur Demaskierung und somit zur Freisetzung der Antigene für 10 Minuten in Citratpuffer (Lösung 1: 5,25 g Citronensäure ad 205 ml mit dest. H₂O, Lösung 2: 14,7 g Trinatriumcitrat Dihydrat ad 500 ml mit dest. H₂O → 18 ml von Lösung 1 + 82 ml von Lösung 2 ad 1000 ml mit dest. H₂O, pH 6,0) gekocht. Nach 20-minütiger Abkühlung wurden die freien Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 20 % in Waschpuffer gelöstem BSA (Bovines Serum Albumin, AppliChem) blockiert. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem Beta-Amyloid-Antikörper (Cell Signaling, #2454), der 1:200 in PBS gelöst wurde. Die Negativkontrolle wurde nur mit PBS behandelt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst 3 x mit Waschpuffer (Tris-HCl + 0,05 % Tween 20) gewaschen und dann für 30 Minuten mit 1:100 in 12,5 % BSA/PBS verdünntem Sekundärantikörper *mouse-anti-rabbit* (Dako) bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte zunächst eine 30-minütige Inkubation mit biotinyliertem *Dako REAL™ Link Secondary Antibody rabbit-anti-mouse* und nach erneutem dreimaligen Waschen eine 30-minütige Inkubation mit *Dako REAL™ APAAP Immunocomplex*. Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliger Waschvorgang und zur Visualisierung eine etwa 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit *Dako REAL™ Chromogen Fast Red (Chromogen Red 1-3 in AP-Substrat-Puffer nach Angaben im Data Sheet verdünnen)*. Die Reaktion wurde durch destilliertes Wasser abgestoppt. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte für 1 Minute in Hämalaun inkubiert und danach in Leitungswasser überführt und 5 Minuten darin inkubiert. Anschließend wurde 1 x mit destilliertem Wasser gewaschen und danach wurden die Schnitte mit Kaisers-Glyceringelantine eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden mit dem *TissueFAXS System Microscope* (TissueGnostics) bei 25- bis 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.14 Statistik

Die Statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die Untersuchungen waren stets unabhängig. Bei allen Ergebnisdaten wurden stets Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Unpaired t-Test* berechnet. Als Signifikanzniveaus (p-Wert) wurden $p \leq 0,05$ (= *), $p \leq 0,01$ (= **) und $p \leq 0,001$ (= ***) gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorkommen von Beta-Amyloid in der menschlichen Haut

Als mögliche Ursache von Acne inversa wird in der Literatur ein Defekt in der γ -Sekretase beschrieben (Wang et al., 2010, Li et al., 2011, Liu et al., 2011b, Pink et al., 2011). Diese Protease führt über Spaltung von Amyloid Precursor Protein zur Entstehung von Beta-Amyloid. Ein partieller Verlust der Presenilin Funktion, welches die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase darstellt, könnte eine Überproduktion von längeren Beta-Amyloid-Fragmenten zur Folge haben (Kelleher and Shen, 2011). Möglicherweise kann die Hautveränderung bei Acne inversa durch Ablagerung von längeren Beta-Amyloid-Fragmenten, nämlich $A\beta_{42}$ oder $A\beta_{43}$, in der Haut erklärt werden (s. 1.6).

Deshalb soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht werden, ob Beta-Amyloid in den betroffenen Hautstellen von Acne inversa vorhanden ist.

3.1.1 Nachweis von Beta-Amyloid in der Haut von Acne inversa Patienten

Zum Nachweis von $A\beta$ in läsionalen Hautproben von Patienten mit Acne inversa wurden nach chirurgischer Exzision der betroffenen Haut zunächst Paraffinschnitte daraus hergestellt. Diese wurden dann, wie in 2.13 beschrieben, mit dem Beta-Amyloid-Antikörper (Cell Signaling, #2454) inkubiert, der zahlreiche Isoformen von Amyloid β , darunter $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$, detektiert. Anschließend wurden die mit dem Antikörper angereicherten Bereiche mit Hilfe des *Dako REAL™ Detection System, APAAP, Mouse* sichtbar gemacht und die immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitte wurden mit dem *TissueFAXS System Microscope* (TissueGnostics) in unterschiedlicher Vergrößerung aufgenommen. Als Negativkontrolle dienten gleich behandelte Proben, die jedoch nur mit PBS anstatt des Antikörpers inkubiert wurden. Die Immunhistochemie zeigte dabei im Vergleich zur Negativkontrolle eine starke Anreicherung des Beta-Amyloid-Antikörpers in den Haarfollikeln der läsionalen Haut (Abbildung 11).

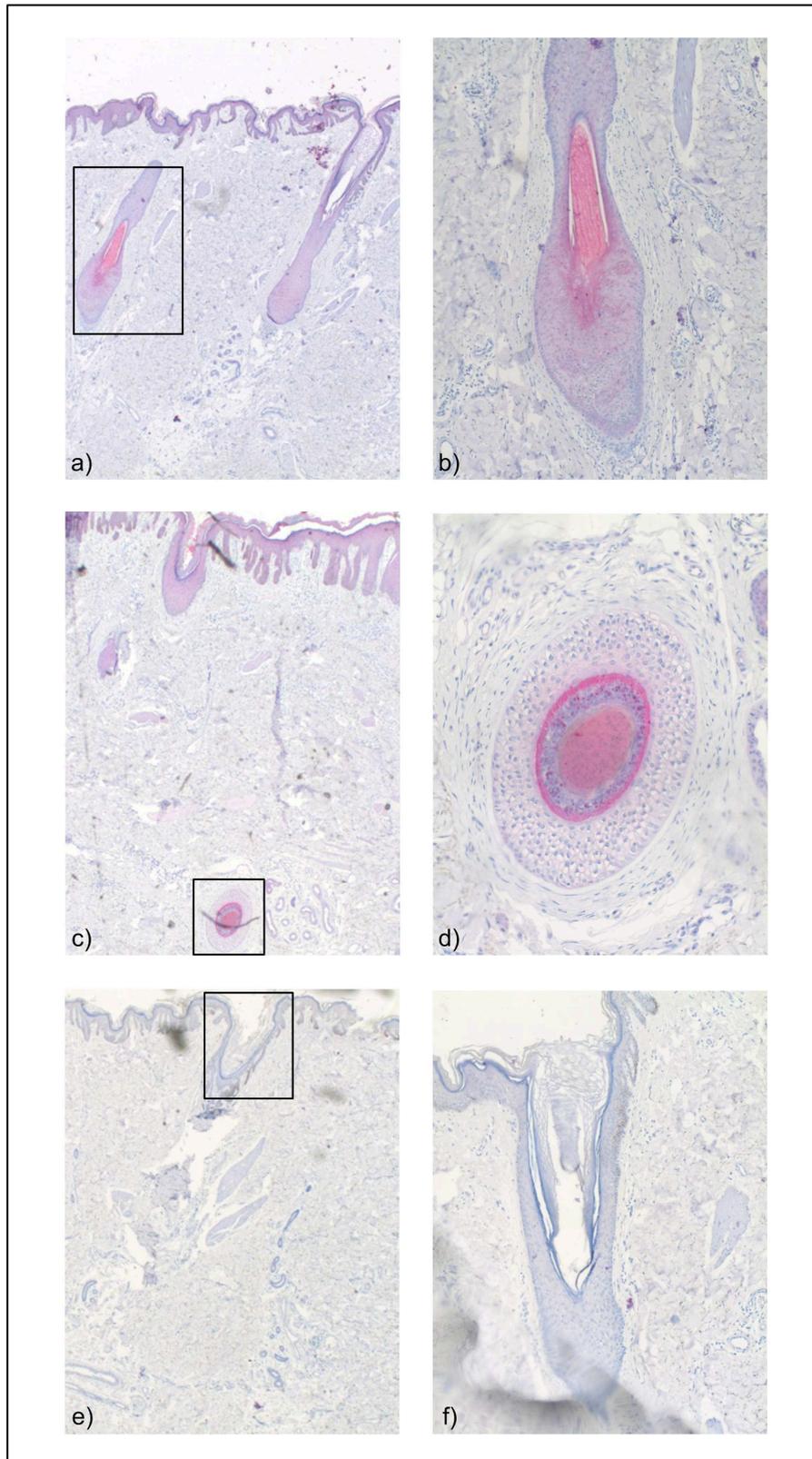


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Acne inversa Hautproben.

a) – d) Acne inversa, Beta-Amyloid-Antikörper (Cell Signaling), e) – f) Acne inversa, Negativkontrolle. Vergrößerung: a) 25-fach, b) 100-fach, c) 25-fach, d) 200-fach, e) 25-fach, f) 100-fach. Paraffinschnitte läsionaler Haut von Acne inversa Patienten wurden nach 2.13 mit einem Beta-Amyloid-Antikörper immunhistochemisch gefärbt.

3.1.2 Nachweis von Beta-Amyloid auch in Kontrollhaut (Narbe)

Um das Ergebnis von 3.1.1 von gesunder Haut abzugrenzen, wurden zusätzlich Hautproben einer Narbe als Kontrolle, wie unter 2.13 beschrieben, mit dem Beta-Amyloid-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Als Negativkontrolle diente eine lediglich mit PBS inkubierte Probe.

Auch in einer Narbe konnte eine positive Reaktion der Haarfollikel auf den Beta-Amyloid-Antikörper festgestellt werden (Abbildung 12).

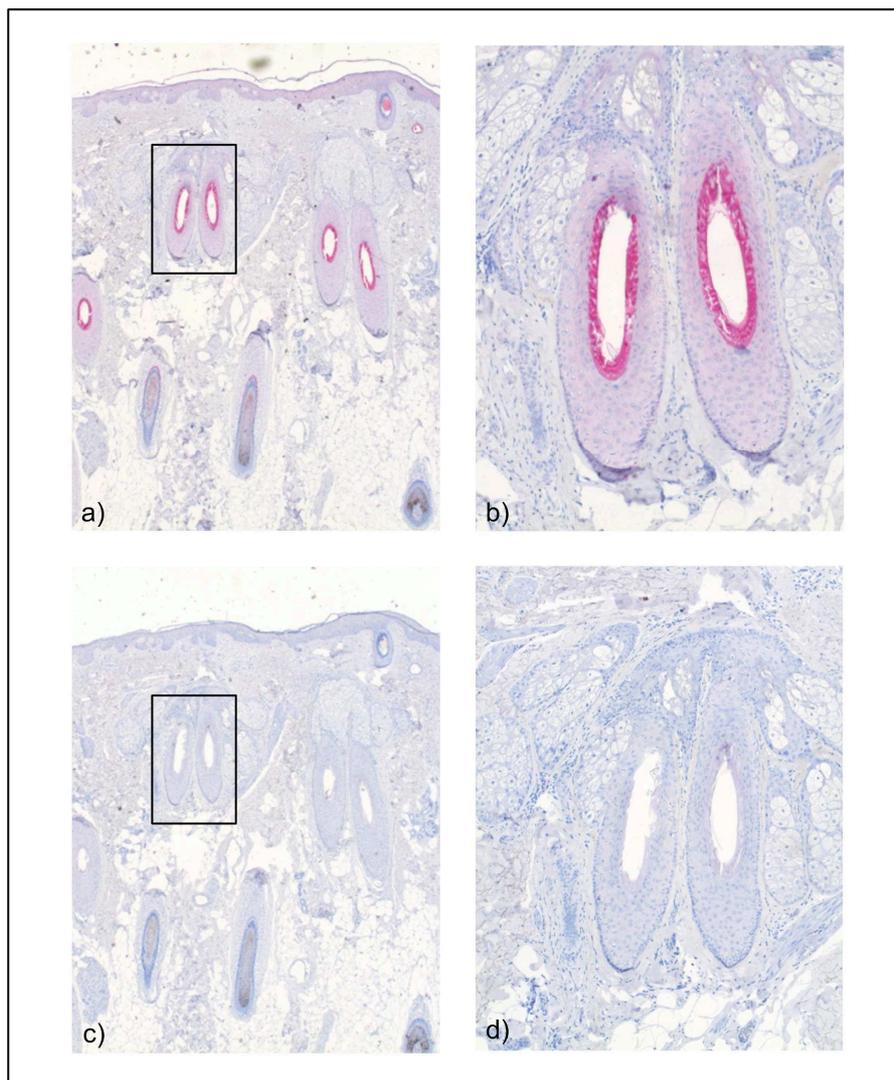


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von Kontrollhaut (Narbe).

a) – b) Kontrollhaut, Beta-Amyloid-Antikörper (Cell Signaling), c) – e) Kontrollhaut, Negativkontrolle. Vergrößerung: a) 25-fach, b) 100-fach, c) 25-fach, d) 100-fach. Paraffinschnitte einer Narbe wurden als Kontrolle nach 2.13 immunhistochemisch mit einem Beta-Amyloid-Antikörper gefärbt.

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl in Acne inversa als auch in Narbengewebe Beta-Amyloid in den Haarfollikeln exprimiert wird.

3.2 Proinflammatorische Wirkung von Beta-Amyloid

Da in läsionaler Haut von Acne inversa Patienten Beta-Amyloid nachgewiesen werden konnte, soll im Weiteren untersucht werden, welche Effekte dieses Protein auf die Zellen der Haut hat.

Zwar sind in der Haut bei einer Abwehr- bzw. Entzündungsreaktion stets mehrere Zelltypen vorhanden, jedoch wird hier nur die Wirkung des Beta-Amyloids auf primäre Keratinozyten erforscht.

Beta-Amyloid wurde bisher vor allem in Hinsicht auf Alzheimer untersucht und hierbei wurde herausgefunden, dass Beta-Amyloid 1-42 in Mikrogliazellen im Gehirn eine Aktivierung des Inflammasoms NLRP3 auslöst (Halle et al., 2008). Durch die Inflammasomaktivierung kommt es zur Spaltung von pro-IL-1 β in seine aktive Form IL-1 β , welches dann aus den Zellen freigesetzt wird.

Auch in Keratinozyten können Inflammasome durch bestimmte Stimuli aktiviert werden und zur Interleukin-1 β -Sekretion führen (Feldmeyer et al., 2010, Dombrowski et al., 2011).

Zunächst soll untersucht werden, ob Beta-Amyloid in Keratinozyten auch als ein solcher Stimulus fungieren kann und ob es *in vitro* nach Stimulation von primären Keratinozyten ebenfalls zu einer IL-1 β -Ausschüttung kommt.

3.2.1 Amyloid β bewirkt eine IL-1 β -Freisetzung aus primären Keratinozyten

Da zunächst unklar war, ob das Beta-Amyloid in die Zellen gelangen muss, um eine Wirkung zu erzielen, oder ob es über Oberflächenrezeptoren einen Signalweg auslöst bzw. internalisiert wird, wurden die primären Keratinozyten zum einen mit 10 μ M A β ₄₂ transfiziert, zum anderen wurden sie in mit 10 μ M A β ₄₂ versetztem EpiLife[®] Medium kultiviert.

Zuvor wurde das Beta-Amyloid 1-42 auf zwei verschiedene Arten vorbehandelt. Ein Teil der angesetzten Stock-Lösung des Beta-Amyloids wurde sofort bei – 80 °C eingefroren, der andere Teil wurde zunächst für eine Woche im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert, um eine mögliche Aktivierung des Peptids zu erreichen (Halle et al., 2008).

Zur Hochregulation von pro-IL-1 β und AIM2 wurden die primären Keratinozyten zunächst für 24 Stunden mit Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ vorstimuliert, indem das Medium mit 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ versetzt wurde.

Im Stimulationsversuch wurden beide Beta-Amyloid-Ansätze verwendet, um festzustellen, welches davon einen stärkeren Effekt auslöst. Als Negativkontrolle dienten dabei mit Wasser (10 μ M) transfizierte, als Positivkontrolle mit poly(dA:dT) (4 μ g/ml) transfizierte Keratinozyten. Nach sechsstündiger Inkubationszeit wurde mittels IL-1 β -ELISA das sezernierte IL-1 β detektiert.

Hierbei konnte eine IL-1 β -Sekretion durch Stimulation mit A β ₄₂ festgestellt werden und es wurde deutlich, dass die IL-1 β -Ausschüttung nach einfacher Kultivierung der Keratinozyten in A β ₄₂ höher war als nach Transfektion. Außerdem hat das bei 37 °C aktivierte A β ₄₂ eine niedrigere IL-1 β -Sekretion zur Folge als das nicht aktivierte (Abbildung 13).

In den darauf folgenden Versuchen wurde deshalb mit nicht aktiviertem Beta-Amyloid 1-42 gearbeitet und es wurde auf die Transfektion verzichtet.

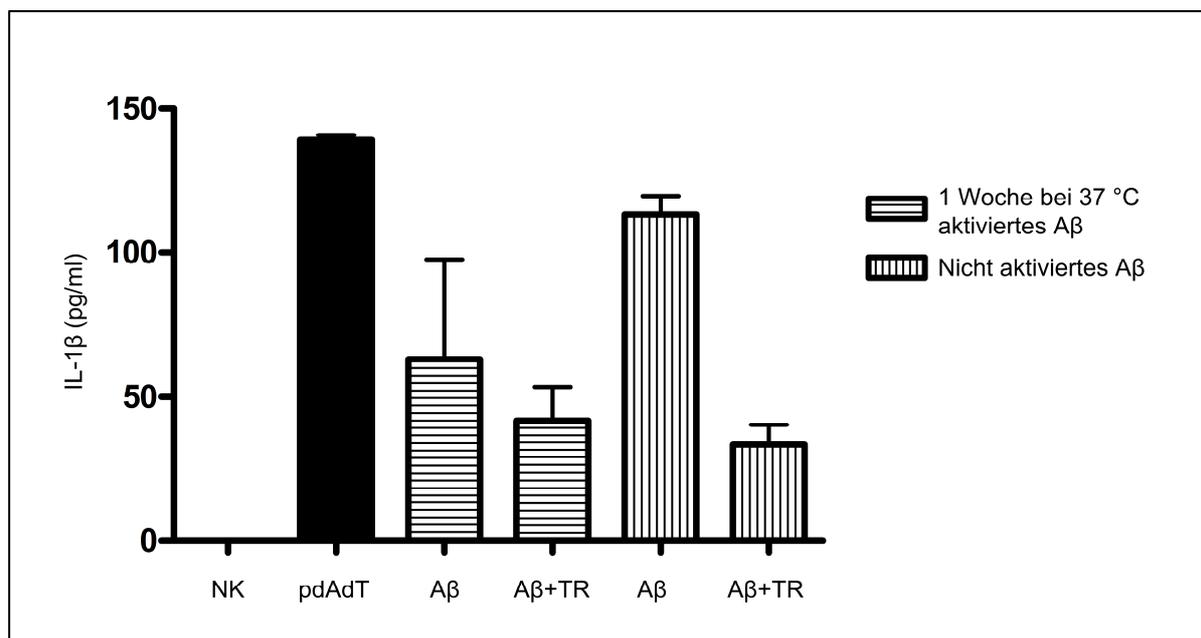


Abbildung 13: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK293T mit A β ₄₂ – mit und ohne Transfektion (TR = Transfektionsreagenz).

Mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml) über 24 h vorstimulierte primäre Keratinozyten wurden mit 10 μ M A β ₄₂ über 6 h stimuliert, indem sie entweder direkt damit transfiziert oder direkt darin kultiviert wurden. Das A β ₄₂ wurde zuvor unterschiedlich vorbehandelt; zum einen wurde es direkt nach Ansetzen der Stock-Lösung bei -80 °C eingefroren, zum anderen 1 Woche bei 37 °C aktiviert. Als Negativkontrolle dienten mit Wasser (10 μ M) transfizierte, als Positivkontrolle mit pdAdT (4 μ g/ml) transfizierte Zellen. Die IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1 β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die direkte Kultivierung in mit nicht aktiviertem A β ₄₂ versetztem Medium führte zur höchsten IL-1 β -Sekretion.

In weiteren Versuchen wurden die benötigte Versuchskonzentration des Beta-Amyloids und die optimale Inkubationszeit für die Experimente ermittelt.

In beiden Versuchsreihen dienten als Negativkontrolle unbehandelte, nur vorstimulierte Zellen, in der Positivkontrolle wurden die Zellen mit 4 µg/ml poly(dA:dT) transfiziert. Die IL-1β-Sekretion wurde mittels ELISA ermittelt.

Für die Zeitkinetik wurden die Zellen nach 24-stündiger Vorstimulation mit TNF-α (10 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml) unterschiedlich lang mit 10 µM Aβ₄₂ stimuliert.

Die Zeitkinetik zeigte, dass eine zweistündige Inkubation bereits ausreichte und dass nach längerer Inkubation weniger IL-1β zu detektieren war (Abbildung 14).

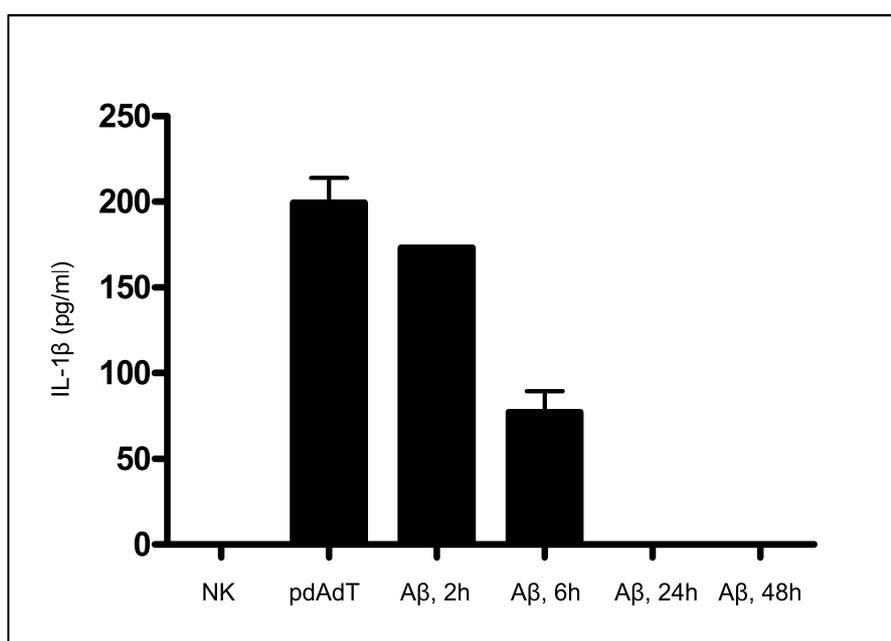


Abbildung 14: IL-1β-Sekretion nach Stimulation von HEK_n mit Aβ₄₂ – Zeitkinetik.

Mit TNF-α (10 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml) über 24 h vorstimulierte primäre Keratinozyten wurden mit 10 µM Aβ₄₂ über 2 h, 6 h, 24 h und 48 h stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, lediglich vorstimulierte Zellen, in der Positivkontrolle wurden die Zellen mit pdAdT (4 µg/ml) transfiziert. Die IL-1β-Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1β-ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die IL-1β-Sekretion sinkt zeitabhängig.

Für den Konzentrationsversuch wurden als zu testende Konzentrationen in Anlehnung an Halle et al. zunächst 1 µM, 5 µM und 10 µM verwendet (Halle et al., 2008). Im Gegensatz zum Zeitkinetik-Versuch war nach Stimulation mit 10 µM Aβ trotz gleicher Versuchsbedingungen kaum IL-1β messbar (Daten nicht aufgeführt). Warum es bei gleicher Stimulationskonzentration zu keiner IL-1β-Sekretion kam, ist unklar. Die Stimulation der mit TNF-α und IFN-γ über 24 Stunden vorstimulierten Zellen wurde mit 5 µM, 10 µM, 20 µM und 40 µM Aβ₄₂ wiederholt.

Hierbei zeigte sich im IL-1 β -ELISA, dass es bei einer Konzentration von 20 μ M bzw. 40 μ M zu einer deutlichen IL-1 β -Ausschüttung kam (Abbildung 15), weshalb in weiteren Versuchen mit diesen Konzentrationen gearbeitet wurde.

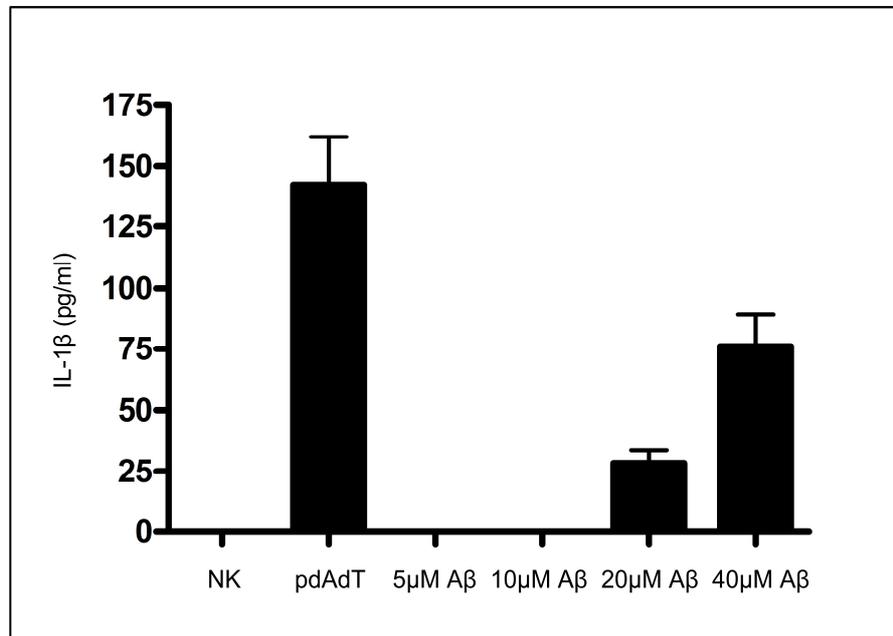


Abbildung 15: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK_n mit A β ₄₂ – Konzentrationsreihe.

Mit TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml) über 24 h vorstimulierte primäre Keratinozyten wurden mit 0 μ M (= Negativkontrolle), 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M A β ₄₂ über 2 h stimuliert. Als Positivkontrolle dienten mit pdAdT (4 μ g/ml) transfizierte Zellen. Die IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1 β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die IL-1 β -Sekretion steigt konzentrationsabhängig an.

Die IL-1 β -Ausschüttung durch poly(dA:dT) kommt über eine AIM2-Aktivierung zustande. Da in gesunder Haut kaum AIM2 exprimiert wird (Dombrowski et al., 2011), ist zur Hochregulation dieses Inflammasoms zunächst eine Vorstimulation mit Interferon- γ nötig, um eine Freisetzung von IL-1 β zu bewirken.

Da bei Keratinozyten bisher nicht bekannt ist, ob und über welches Inflammasom Beta-Amyloid zur IL-1 β -Ausschüttung führt, wurde untersucht, ob dies auch bei einer Stimulation mit A β ₄₂ notwendig ist. In den vorigen Versuchen wurde ebenfalls mit Tumornekrosefaktor- α vorstimuliert, was die Expression von pro-IL-1 β hochreguliert. Auch dies soll auf seine Notwendigkeit überprüft werden. Die Ergebnisse zeigten, dass weder eine Vorstimulation mit IFN- γ noch mit TNF- α notwendig ist. Mit und ohne Vorstimulation führten gleiche Konzentrationen an Beta-Amyloid zu gleich hohen IL-1 β -Spiegeln (Abbildung 16). Deshalb wurde in den darauf folgenden Versuchen auf die Vorstimulation verzichtet.

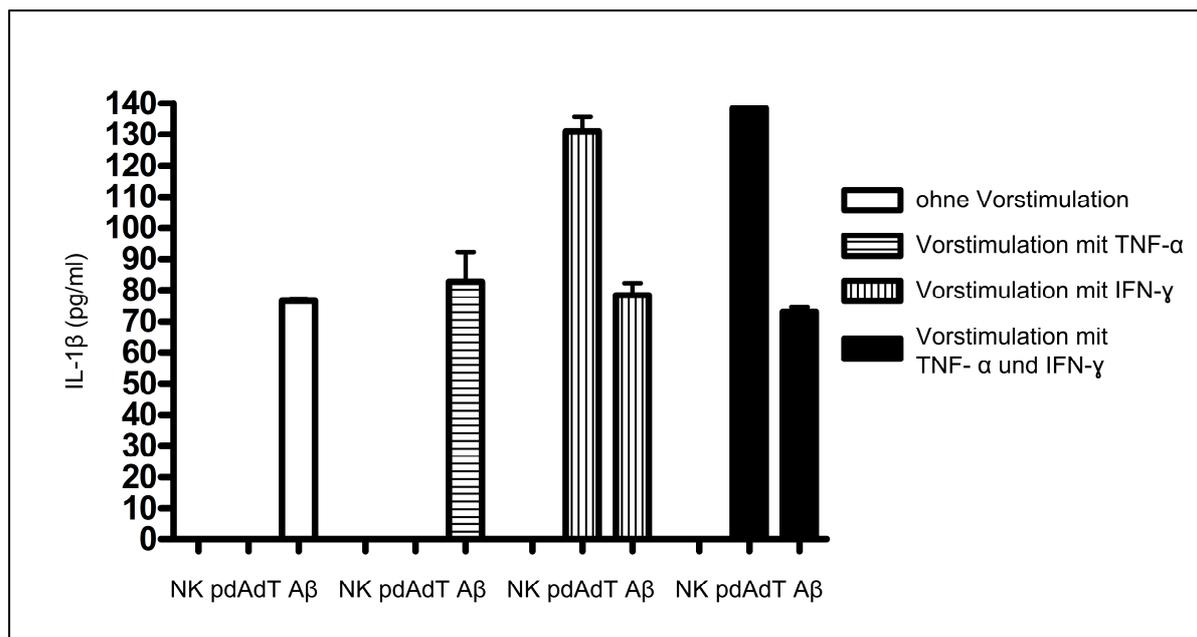


Abbildung 16: IL-1β-Sekretion nach Stimulation von HEK cells mit Aβ₄₂ – mit und ohne Vorstimulation mit TNF-α und IFN-γ.

Primäre Keratinozyten wurden mit und ohne eine 24-stündige Vorstimulation mit TNF-α (10 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml) für 2 h mit 20 μM Aβ₄₂ stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, nur vorstimulierte Zellen, in der Positivkontrolle wurden die Zellen mit pdAdT (4 μg/ml) transfiziert. Die IL-1β-Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1β-ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Eine Vorstimulation mit TNF-α und IFN-γ hatte keinen Einfluss auf die IL-1β-Sekretion.

3.2.2 Amyloid β hat keinen Einfluss auf die IL-18-Sekretion

Da es nach Aktivierung eines Inflammasomkomplexes nicht nur zur Spaltung von pro-IL-1β zu seiner aktiven Form kommt, sondern auch pro-IL-18 zu IL-18 gespalten wird, wurde die IL-18-Sekretion von primären Keratinozyten nach Stimulation mit Beta-Amyloid 1-42 ebenfalls mittels ELISA gemessen.

In den Überständen der mit Aβ₄₂ stimulierten Zellen, in denen zuvor IL-1β detektiert wurde, konnten allerdings im Vergleich zu den Überständen der unstimulierten Zellen keine erhöhten Spiegel an IL-18 nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt).

3.2.3 Amyloid β bewirkt eine IFN-β-Freisetzung aus primären Keratinozyten

Da eine proinflammatorische Aktivität von Amyloid β nicht nur über Inflammasome zustande kommen kann, soll auch ein anderer Mechanismus in Betracht gezogen werden. Nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren kommt es neben einer Ausschüttung von Interleukinen auch zu einer Produktion und Sekretion von Typ I Interferonen. Deshalb soll im Folgenden überprüft werden, ob bei der Stimulation von

primären Keratinozyten mit Beta-Amyloid 1-42 ebenso Interferon- β detektiert werden kann.

Aus dem Zellüberstand der mit $A\beta_{42}$ stimulierten primären Keratinozyten wurde mittels IFN- β -ELISA die Konzentration an sezerniertem IFN- β ermittelt.

Da das Ergebnis positiv war, wurden, genau wie bei der IL-1 β -Sekretion, eine Konzentrationsreihe und eine Zeitkinetik durchgeführt.

Hierzu wurden die primären Keratinozyten mit 0 μ M (= Negativkontrolle), 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M $A\beta_{42}$ über zwei Stunden stimuliert. Der aus dem Zellüberstand durchgeführte IFN- β -ELISA zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der IFN- β -Sekretion (Abbildung 17).

Für den Zeitversuch wurden HEK293T unterschiedlich lang mit 40 μ M $A\beta_{42}$ stimuliert. Da hierbei eine andere Chargen-Nummer des Beta-Amyloids verwendet wurde, wurde das Peptid direkt vor Anwendung nach 2.3 vorbehandelt, um $A\beta$ -Monomere herzustellen und so einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Im ELISA konnte nach einer Stunde die höchste IFN- β -Sekretion gemessen werden, danach sank die IFN- β -Konzentration zeitabhängig wieder ab (Abbildung 18).

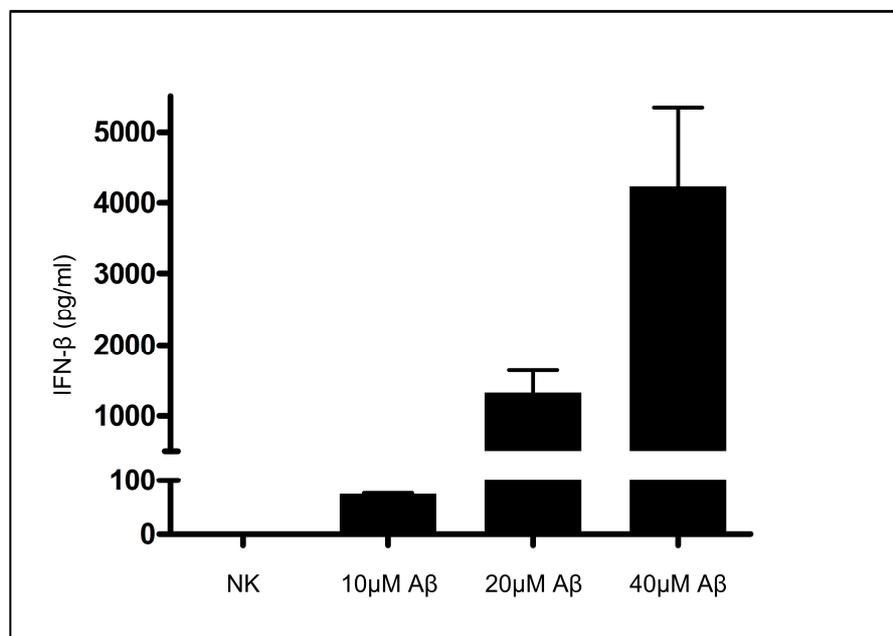


Abbildung 17: IFN- β -Sekretion nach Stimulation von HEK293T mit $A\beta_{42}$ – Konzentrationsreihe.

Primäre Keratinozyten wurden mit 0 μ M (= Negativkontrolle), 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M $A\beta_{42}$ über 2 h stimuliert. Die IFN- β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IFN- β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die IFN- β -Sekretion steigt konzentrationsabhängig an.

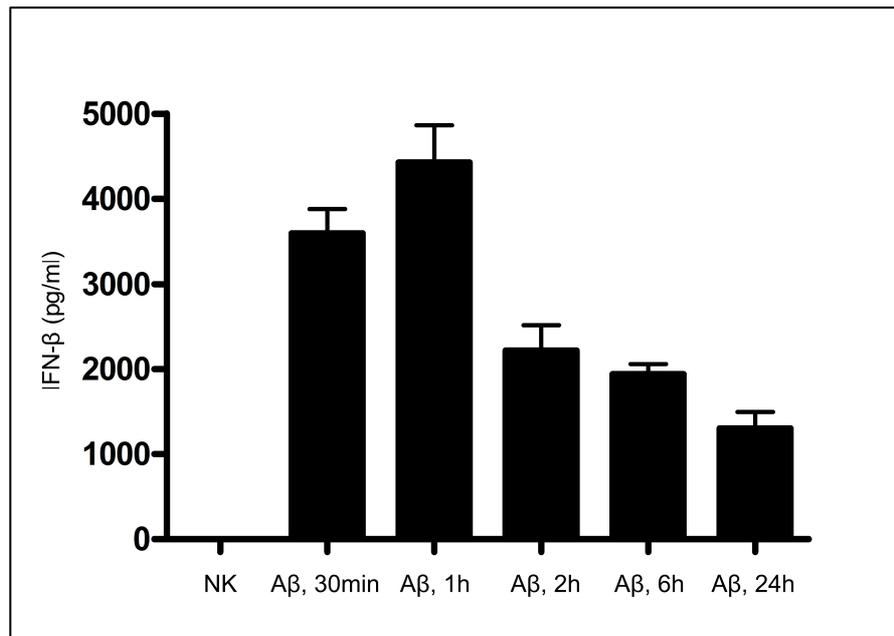


Abbildung 18: IFN- β -Sekretion nach Stimulation von HEKs mit A β_{42} – Zeitkinetik.

Primäre Keratinozyten wurden über 30 min, 1 h, 2 h, 6 h und 24 h mit 40 μ M nach 2.3 vorbehandeltem A β_{42} stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die IFN- β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IFN- β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Nach 1 h konnte die höchste IFN- β -Sekretion gemessen werden.

3.2.4 Amyloid β bewirkt auch auf Gen-Ebene eine IFN- β -Induktion in HEKs

Da Proteine nicht nur sofortige Effekte auf Zellen haben, sondern auch über Veränderung der Genexpression langfristige Veränderungen bewirken können, wurde die Genexpression von primären Keratinozyten nach zweistündiger bzw. sechsständiger Stimulation mit Beta-Amyloid 1-42 mittels Real-Time PCR untersucht. Hierzu wurde nach dem Stimulationsversuch zunächst, wie in 2.6 beschrieben, die RNA aus den Keratinozyten isoliert und nach 2.7 in cDNA umgeschrieben. Mit diesen cDNA-Proben wurde anschließend eine semi-quantitative Real-Time PCR (s. 2.8) durchgeführt und dabei die Expression von IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α und pro-IL-1 β analysiert. Als Referenz diente die cDNA unbehandelter Zellen.

Es zeigte sich, dass es nach sechsständiger Stimulation der Keratinozyten mit A β_{42} zu einer signifikanten ($p = 0,0038$) Induktion von IFN- β kam (Abbildung 19). Nach zwei Stunden war die IFN- β -Expression noch unverändert zur Negativkontrolle.

Bei den Untersuchungen von IFN- α , IFN- γ , TNF- α und pro-IL-1 β zeigten sich weder nach zwei noch nach sechs Stunden Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 20).

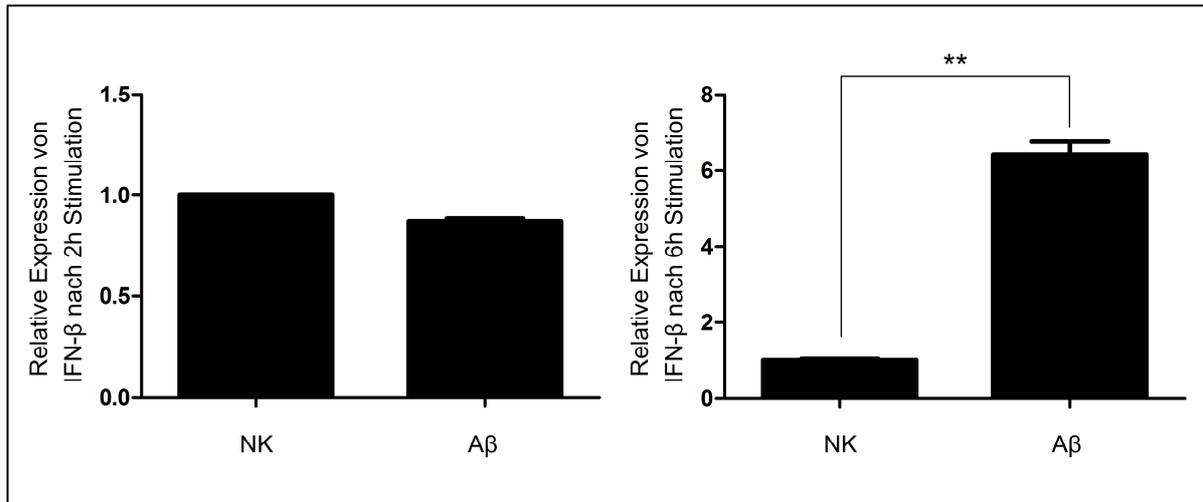


Abbildung 19: Relative Expression von IFN-β in HEK293T nach 2 h bzw. 6 h Stimulation mit Aβ₄₂.

Primäre Keratinozyten wurden über 2 h und 6 h mit Aβ₄₂ stimuliert. Nach RNA-Isolierung (s. 2.6) aus den Zellen und Umschreiben der RNA in cDNA (s. 2.7) wurde nach 2.8 eine Real-Time PCR durchgeführt, um die relative Expression von IFN-β in der cDNA der mit Aβ₄₂ stimulierten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Zellen (= Negativkontrolle) zu ermitteln. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Nach 6-stündiger Stimulation war die Expression von IFN-β im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant ($p = 0,0038$) erhöht.

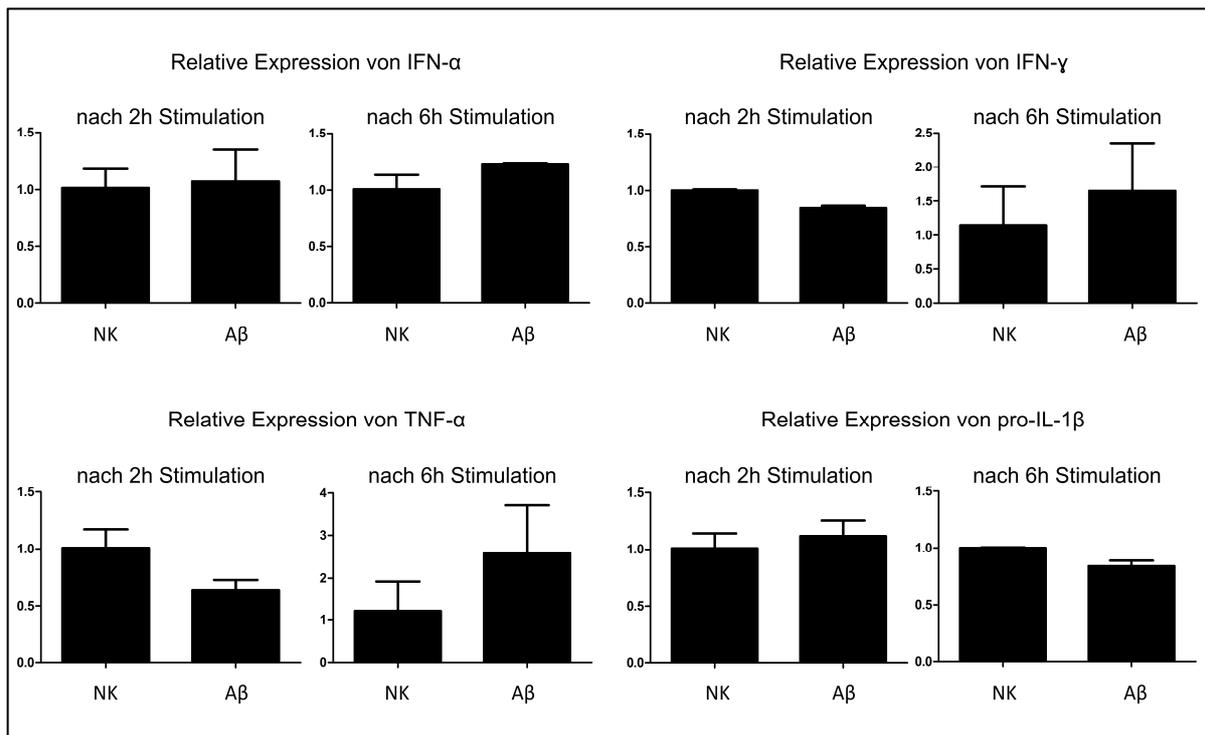


Abbildung 20: Relative Expression von IFN-α, IFN-γ, TNF-α und pro-IL-1β in HEK293T nach 2 h bzw. 6 h Stimulation mit Aβ₄₂.

Primäre Keratinozyten wurden über 2 h und 6 h mit Aβ₄₂ stimuliert. Nach RNA-Isolierung (s. 2.6) aus den Zellen und Umschreiben der RNA in cDNA (s. 2.7) wurde nach 2.8 eine Real-Time PCR durchgeführt, um die relative Expression von IFN-α, IFN-γ, TNF-α und pro-IL-1β in der cDNA der mit Aβ₄₂ stimulierten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Zellen (= Negativkontrolle) zu ermitteln. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Dabei war weder nach 2 h noch nach 6 h eine signifikante Veränderung in der Expression dieser Gene zu ermitteln.

3.3 Beta-Amyloid ist nicht zytotoxisch für Keratinozyten

Da das Zytokin Interleukin-1 β auch bei Zellsterben durch die sich auflösende Zellmembran aus der Zelle freigesetzt werden kann, soll nun überprüft werden, ob das zu messende IL-1 β nach Stimulation der primären Keratinozyten mit Beta-Amyloid tatsächlich aus der viablen Zelle freigesetzt wird.

Hierzu wurden die Keratinozyten über zwei Stunden mit 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M Beta-Amyloid 1-42 stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle mit poly(dA:dT) transfizierte Zellen. Anschließend wurden mit den Zellen ein WST-1-Assay nach 2.12.1 sowie ein Kristallviolett-Assay nach 2.12.2 durchgeführt.

Beide Zytotoxizitäts-Assays wiesen eine mit der Negativkontrolle vergleichbare Viabilität der mit Beta-Amyloid stimulierten Zellen nach (Abbildung 21, Abbildung 22).

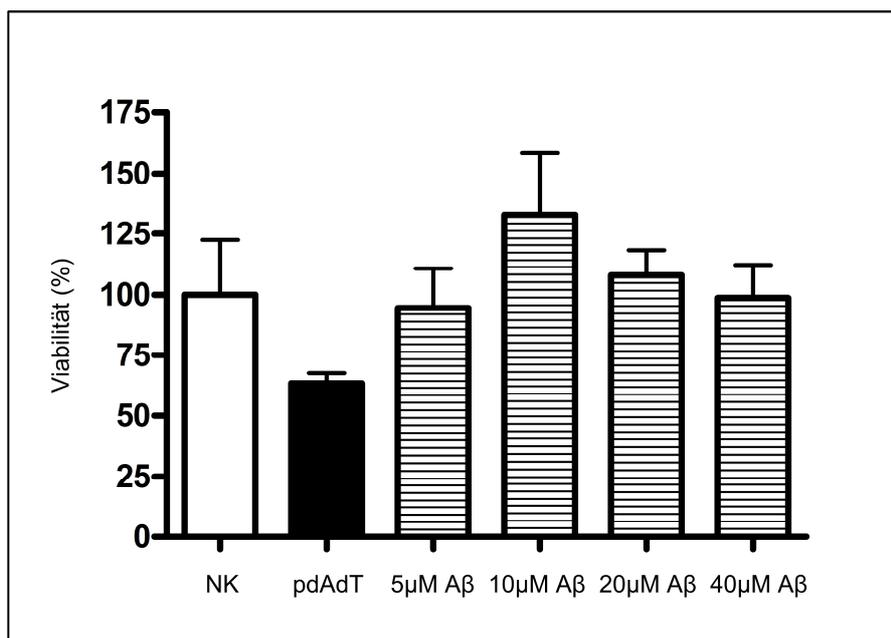


Abbildung 21: WST-1-Assay nach zweistündiger Stimulation von HEK_n mit A β ₄₂.

Primäre Keratinozyten wurden mit 0 μ M (= Negativkontrolle), 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M A β ₄₂ über 2 h sowie 4 μ g/ml pdAdT stimuliert. Nach Zugabe des verdünnten WST-1-Reagenz wurde die Absorption nach zweistündiger Inkubation mit diesem Reagenz mittels Spektrometer gemessen (s. 2.12.1). Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die Viabilität der unbehandelten Keratinozyten und die der Keratinozyten nach zweistündiger Stimulation mit A β ₄₂ sind vergleichbar hoch. Die Viabilität der Zellen nach Stimulation mit pdAdT ist im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant erniedrigt.

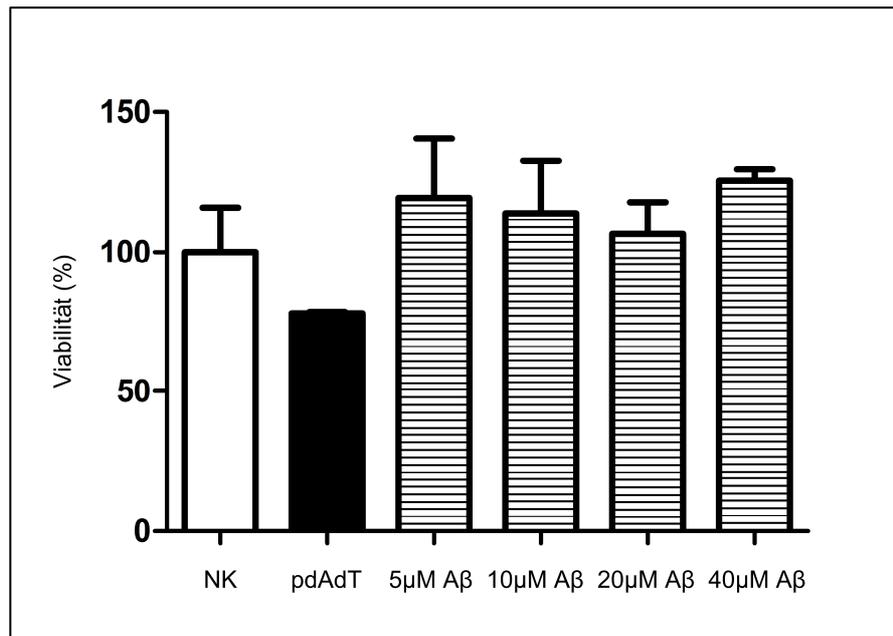


Abbildung 22: Kristallviolett-Assay nach zweistündiger Stimulation von HEK293 mit Aβ₄₂.

Primäre Keratinozyten wurden mit 0 μM (= Negativkontrolle), 5 μM, 10 μM, 20 μM und 40 μM Aβ₄₂ über 2 h sowie 4 μg/ml pdAdT stimuliert. Anschließend wurde, wie in 2.12.2 beschrieben, ein Kristallviolett-Assay durchgeführt und die Absorption wurde mittels Spektrometer gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die Viabilität der unbehandelten Keratinozyten und die der Keratinozyten nach zweistündiger Stimulation mit Aβ₄₂ sind vergleichbar hoch. Die Viabilität der Zellen nach Stimulation mit pdAdT ist im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant erniedrigt.

Zur Bestätigung der nicht zytotoxischen Wirkung von Beta-Amyloid wurde zusätzlich ein BrdU-Assay nach 2.12.3 durchgeführt. Bei diesem Zytotoxizitäts-Test wird das Pyrimidin-Analogon BrdU an Stelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und kann anschließend durch einen Antikörper mittels ELISA detektiert werden.

Da die Inkubation mit Amyloid β und BrdU gleichzeitig und außerdem über 24 Stunden geschieht, ist diese Methode ein noch aussagekräftigerer Test zum Ausschluss einer Zytotoxizität von Beta-Amyloid.

Da in den vorherigen Zytotoxizitäts-Assays kein Unterschied der Viabilität bei den verschiedenen Konzentrationen von Amyloid β festzustellen war, soll im folgenden Versuch mit der mittleren Konzentration von 20 μM gearbeitet werden.

Das Medium der Keratinozyten wurde hierzu zunächst mit 20 μM Aβ₄₂ versetzt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, in EpiLife[®] Medium kultivierte Zellen, als Positivkontrolle mit poly(dA:dT) transfizierte Zellen. Dem Medium aller *wells* wurden zusätzlich 10 % des Mediumvolumens an 1:100 in EpiLife[®] Medium verdünntem *BrdU labeling reagent* hinzugefügt. Dann wurden die Keratinozyten über 24 Stunden

im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels ELISA gemessen.

Der Zytotoxizitäts-Test zeigte, dass die Keratinozyten nach Stimulation mit Beta-Amyloid auch nach einer solch langen Inkubationszeit im Vergleich zur Negativkontrolle nicht wesentlich geschädigt waren (Abbildung 23).

Anhand dieser Ergebnisse konnte bewiesen werden, dass das im ELISA messbare IL-1 β nicht durch Zellsterben freigesetzt wird. Es handelt sich also um aktiv sezerniertes Protein.

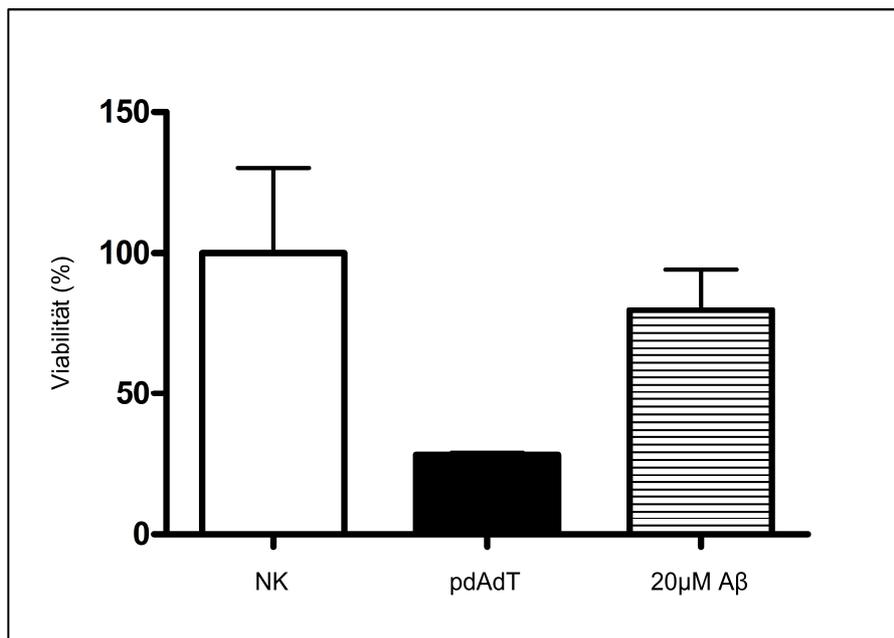


Abbildung 23: BrdU-Assay nach zweistündiger Stimulation von HEK_n mit A β ₄₂.

Primäre Keratinozyten wurden mit 0 μ M (= Negativkontrolle) und 20 μ M A β ₄₂ sowie 4 μ g/ml pdAdT über 24 h stimuliert. Dem bereits mit A β ₄₂ versetzten Medium wurden zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns zusätzlich, wie in 2.12.3 beschrieben, jeweils 10 % des Mediumvolumens von dem 1:100 in EpiLife[®] Medium verdünnten *BrdU labeling reagent* hinzugefügt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Viabilität der Zellen mittels ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die Viabilität der unbehandelten Keratinozyten und die der Keratinozyten nach 24-stündiger Stimulation mit A β ₄₂ sind vergleichbar hoch. Die Viabilität der Zellen nach Stimulation mit pdAdT ist im Vergleich zur Negativkontrolle auf Grund der hohen Standardabweichung der Negativkontrolle nicht signifikant erniedrigt.

3.4 Mechanismus der Zytokinsekretion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Stimulation von Keratinozyten mit exogenem $A\beta_{42}$ eine Interleukin-1 β - und eine Interferon- β -Sekretion zur Folge hat. Das mittels ELISA detektierte IL-1 β wird aktiv freigesetzt. Der Mechanismus der Zytokinproduktion in Keratinozyten durch Beta-Amyloid ist bisher unbekannt und wird im Folgenden genauer untersucht.

3.4.1 Die IL-1 β -Sekretion erfolgt NLRP3-unabhängig

Beta-Amyloid spielt eine große Rolle in der Pathogenese von Alzheimer. In der Alzheimer-Forschung identifizierten Halle et al. den NOD-like Rezeptor NLRP3 als Sensor von Beta-Amyloid und somit als Auslöser für die nachfolgende IL-1 β -Sekretion (Halle et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob NLRP3 auch in Keratinozyten als Vermittler der Zytokinfreisetzung fungiert.

Hierzu wurde in den primären Keratinozyten mittels Transfektion der entsprechenden siRNA ein Knockdown von NLRP3 durchgeführt und anschließend wurden die Zellen über zwei Stunden mit $A\beta_{42}$ stimuliert.

Da ein aktivierter Inflammasomkomplex aus dem entsprechenden NOD-like Rezeptor und einer inflammatorischen Caspase besteht, die, falls nötig, über das Adaptermolekül ASC verbunden sind, wurden mittels ASC-siRNA und Caspase-1-siRNA auch die jeweils hierfür kodierenden Gene ausgeschaltet.

Nach der Transfektion der NLRP3-, ASC- und Caspase-1-siRNA nach 2.4 wurden die Keratinozyten zunächst 48 Stunden kultiviert, bevor dann die zweistündige Stimulation der Zellen mit Beta-Amyloid erfolgte. Als Negativkontrollen dienten mit Wasser (NK) und mit Control-siRNA transfizierte Zellen. Die IL-1 β -Sekretion wurde mittels ELISA gemessen.

Die im Zellüberstand zu detektierende IL-1 β -Konzentration war sowohl nach Knockdown von NLRP3 als auch von ASC und Caspase-1 vergleichbar hoch wie die der Negativkontrolle (Abbildung 24). Die Interleukin-1 β -Sekretion erfolgt also NLRP3-unabhängig und vermutlich sogar Inflammasom-unabhängig, da das Ausschalten von ASC und Caspase-1 ebenfalls keine Reduktion in der Freisetzung der Zytokins bewirkt.

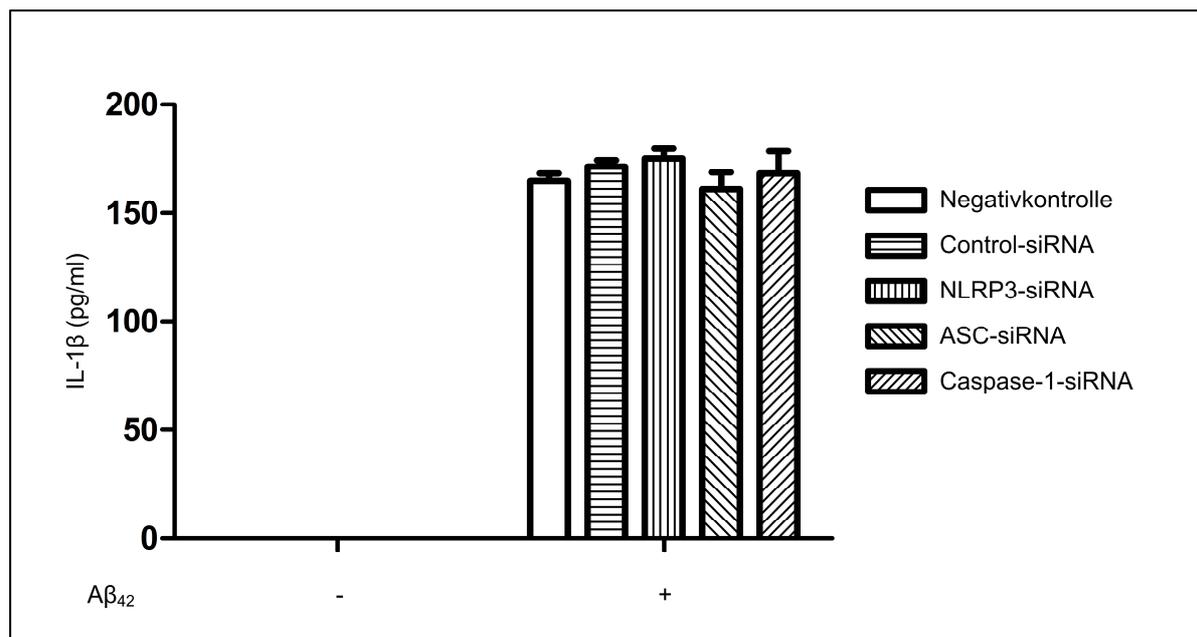


Abbildung 24: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK293 mit A β ₄₂ nach Knockdown von NLRP3, ASC und Caspase-1.

Primäre Keratinozyten wurden nach 2.4 mit NLRP3-, ASC- und Caspase-1-siRNA transfiziert und über 48 h inkubiert. Anschließend wurden sie über 2 h mit 40 μ M A β ₄₂ stimuliert. Als Negativkontrollen dienten mit Wasser (NK) und mit Control-siRNA transfizierte Zellen. Die IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1 β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Triplikaten dargestellt. Der Knockdown der Inflammasombestandteile führte zu keiner Reduktion der IL-1 β -Sekretion im Vergleich zur Negativkontrolle und zur Control-siRNA. Die IL-1 β -Sekretion erfolgt also NLRP3-unabhängig und vermutlich auch Inflammasom-unabhängig.

3.4.2 Die IL-1 β -Sekretion erfolgt unabhängig von Matrix-Metalloproteinasen

Ein weiterer Signalweg, der zu einer Interleukin-1 β -Freisetzung führt, ist die Prozessierung von pro-IL-1 β durch Matrix-Metalloproteinasen. Dabei ist vor allem Stromelysin-1 (MMP-3) in der Lage, bereits nach einer Stunde biologisch aktives IL-1 β zu produzieren, dessen Aktivität nach 8 – 24 Stunden wieder abnimmt (Schonbeck et al., 1998).

Da in den bisherigen Versuchen ebenfalls eine schnelle Prozessierung von pro-IL-1 β zu IL-1 β stattfand und dieses Zytokin nach 24 Stunden nicht mehr im Zellüberstand zu detektieren war, soll nun überprüft werden, ob Matrix-Metalloproteinasen dafür verantwortlich sind.

Hierzu wurde mit 10 μ M und 25 μ M Ionomycin nach 2.5 über 24 Stunden eine Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -8 und -9 in den Keratinozyten durchgeführt. Da der MMP-Inhibitor in DMSO gelöst wurde, dienten als Negativkontrollen sowohl unbehandelte als auch in mit 25 μ M DMSO versetztem

Medium kultivierte Zellen. Anschließend wurden die Keratinozyten mit Beta-Amyloid über zwei Stunden stimuliert. Die IL-1 β -Sekretion wurde mittels ELISA gemessen. Jedoch zeigte sich auch nach Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen keine Reduktion in der Interleukin-1 β -Freisetzung (Abbildung 25). Der Mechanismus erfolgt also MMP-unabhängig.

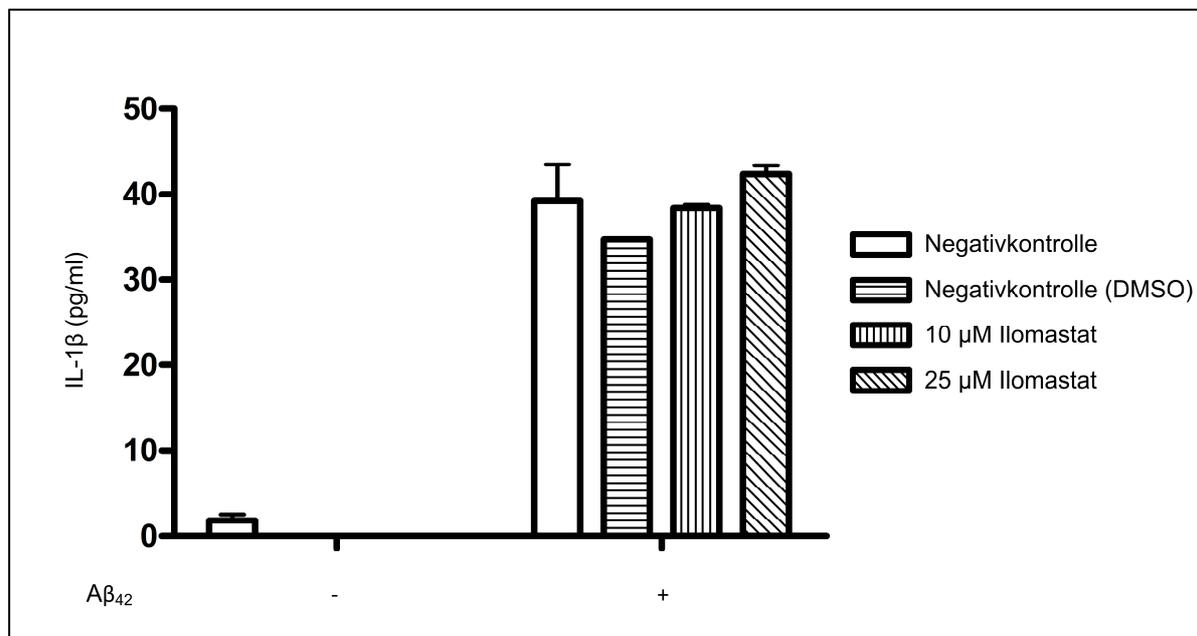


Abbildung 25: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK_n mit A β ₄₂ nach Inhibition von MMP. Primäre Keratinozyten wurden über 24 h in 10 μ M und 25 μ M Iloprost, einem MMP-Inhibitor, inkubiert und anschließend über 2 h mit 40 μ M A β ₄₂ stimuliert. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte sowie in mit 25 μ M DMSO versetztem Medium kultivierte Zellen. Die IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1 β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen führte zu keiner Reduktion der IL-1 β -Sekretion. Die IL-1 β -Freisetzung erfolgt also MMP-unabhängig.

3.4.3 Die IL-1 β -Sekretion erfolgt TLR2-unabhängig

Ein weiterer in der Literatur beschriebener Signalweg für Beta-Amyloid läuft über den Toll-like Rezeptor 2. Liu et al. beschrieben TLR2 als primären Rezeptor dieses Proteins, um die neuroinflammatorische Aktivität zu triggern (Liu et al., 2011a).

Im Folgenden soll nun überprüft werden, ob dieser Toll-like Rezeptor auch in der Haut an der Signalkaskade beteiligt ist.

Hierzu wurden die primären Keratinozyten, wie in 2.4 beschrieben, mit TLR2-siRNA transfiziert und über 48 Stunden kultiviert. Als Negativkontrollen dienten zum einen mit Wasser transfizierte und zum anderen mit Control-siRNA transfizierte Zellen.

Anschließend wurden die Keratinozyten über 2 Stunden mit Beta-Amyloid 1-42 stimuliert. Die IL-1 β -Sekretion wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Auch in diesen Versuchen konnte keine Reduktion der IL-1 β -Freisetzung im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden (Abbildung 26). Die Signalkaskade erfolgt also auch TLR2-unabhängig.

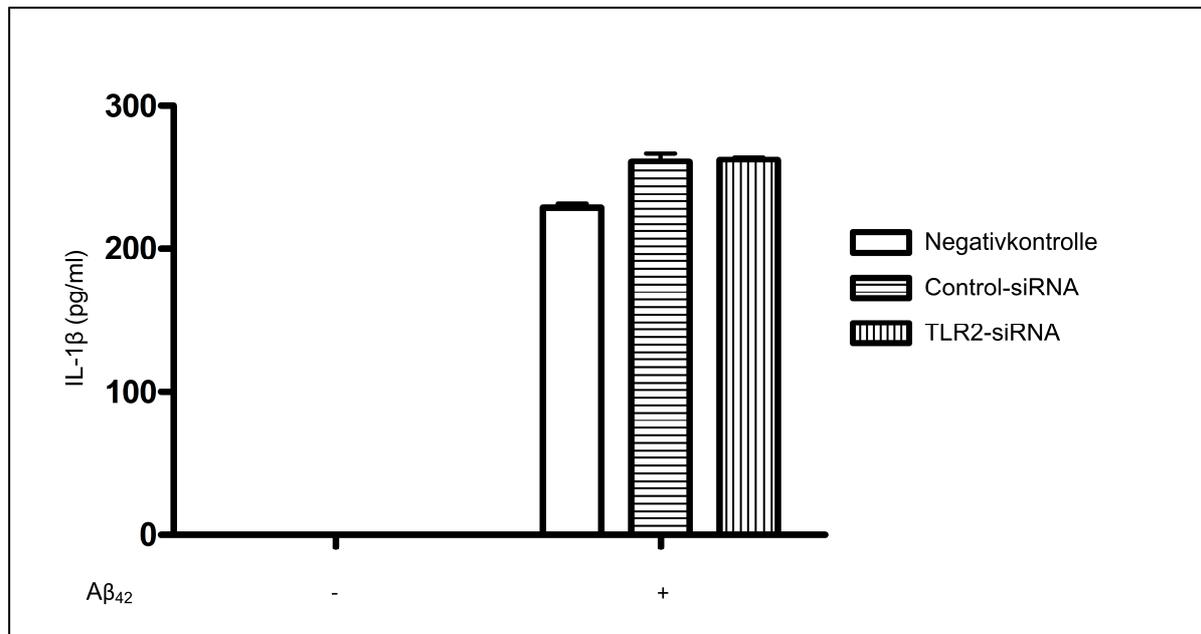


Abbildung 26: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK_n mit A β_{42} nach Knockdown von TLR2.

Primäre Keratinozyten wurden nach 2.4 mit TLR2-siRNA transfiziert und über 48 h inkubiert. Anschließend wurden sie über 2 h mit 40 μ M A β_{42} stimuliert. Als Negativkontrollen dienten mit Wasser (NK) und mit Control-siRNA transfizierte Zellen. Die IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1 β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Der Knockdown von TLR2 führte zu keiner Reduktion der IL-1 β -Sekretion im Vergleich zur Negativkontrolle und zur Control-siRNA. Der Signalweg erfolgt also TLR2-unabhängig.

3.4.4 MyD88 als Mediator der Signalkaskade

Da Toll-like Rezeptoren (vgl. 1.2.1) nach ihrer Aktivierung verschiedene Adaptermoleküle rekrutieren, um dann über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und Typ I Interferonen zu vermitteln, soll überprüft werden, ob eines dieser Adaptermoleküle oder auch ein Transkriptionsfaktor für die Signalkaskade verantwortlich ist.

Da MyD88 bei allen membranständigen TLRs außer TLR3 als Adaptermolekül fungiert, soll das Hauptaugenmerk hierauf gerichtet werden.

Neben TLR2 wird in der Literatur auch TLR4 eine Rolle in der Signalkaskade von Amyloid β zugeschrieben (Liu et al., 2011a, Capiralla et al., 2012). TLR4 rekrutiert als Adaptermoleküle MyD88/TIRAP und TRIF/TRAM (Kawai and Akira, 2006). Um beide Adaptermolekülpaare zu hemmen, wurde im folgenden Versuch ein Knockdown von MyD88 und TRIF durchgeführt.

Die Stimulation mit $A\beta_{42}$ scheint einen sehr großen Effekt auf die Typ I Interferon-Produktion, insbesondere von IFN- β , zu haben. Dies wird auch an der erheblich gesteigerten relativen Expression von IFN- β auf Gen-Ebene deutlich (s. 3.2.4). Da Typ I Interferone über *Interferon Regulatory Factors* (IRFs) transkribiert werden, sollen im folgenden Versuch des Weiteren IRF1, IRF3 und IRF5 ausgeschaltet werden, um zu überprüfen, ob diese eine Rolle in der Signalkaskade spielen.

Hierzu wurden die Keratinozyten zunächst mit MyD88-, TRIF-, IRF1-, IRF3- und IRF5-siRNA transfiziert und über 48 Stunden kultiviert. Als Negativkontrollen dienten zum einen mit Wasser (NK), zum anderen mit Control-siRNA transfizierte Zellen. Anschließend wurden die Keratinozyten über zwei Stunden mit $A\beta_{42}$ stimuliert. Da bei diesem Versuch mit einer anderen Chargen-Nummer des Beta-Amyloids gearbeitet wurde, wurde das Peptid direkt vor der Stimulation nach 2.3 vorbehandelt, um $A\beta$ -Monomere herzustellen und so einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen. Im Zellüberstand wurden die IL-1 β -Ausschüttung mittels IL-1 β -ELISA und die IFN- β -Freisetzung mittels IFN- β -ELISA gemessen.

Die IL-1 β -Sekretion war nach Knockdown von TRIF nicht signifikant erhöht ($p = 0,6179$). Der Knockdown von MyD88 bzw. der *Interferon Regulatory Factors* führte im Vergleich zu den Negativkontrollen zu etwa gleich hohen IL-1 β -Spiegeln (Abbildung 27).

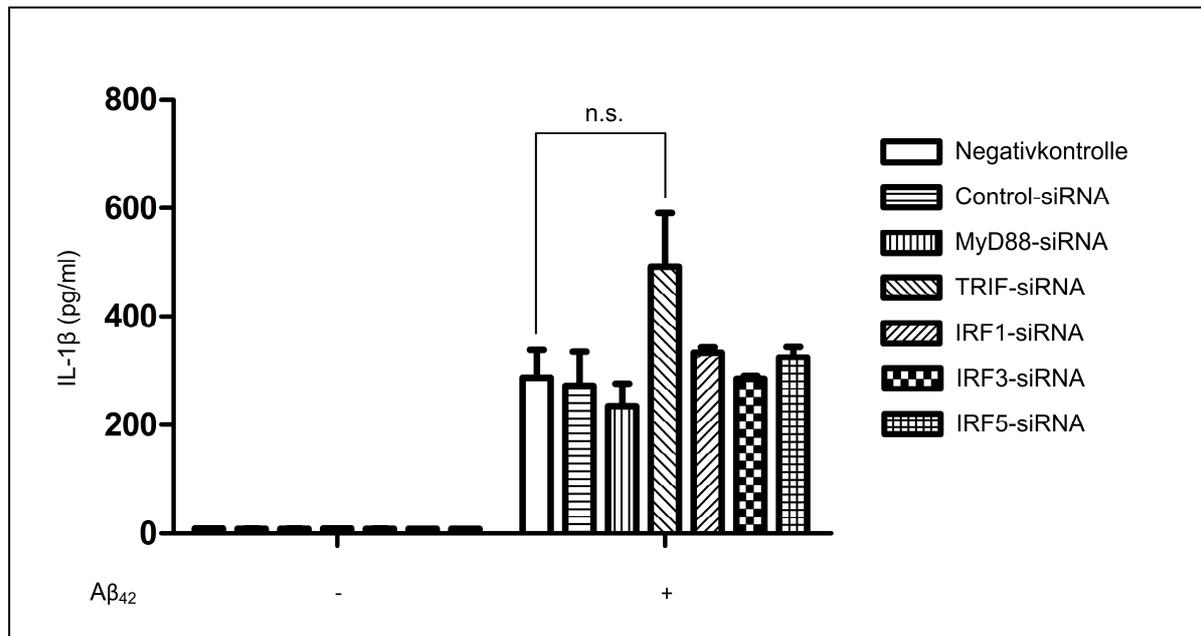


Abbildung 27: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK293 mit A β ₄₂ nach Knockdown von verschiedenen an der Signalkaskade beteiligten Adaptermolekülen und *Interferon Regulatory Factors*.

Primäre Keratinozyten wurden nach 2.4 mit MyD88-, TRIF-, IRF1-, IRF3- und IRF5-siRNA transfiziert und über 48 h inkubiert. Anschließend wurden sie über 2 h mit 40 μ M nach 2.3 vorbehandeltem A β ₄₂ stimuliert. Als Negativkontrollen dienten mit Wasser (NK) und mit Control-siRNA transfizierte Zellen. Die IL-1 β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-1 β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die IL-1 β -Sekretion ist nach Knockdown von TRIF nicht signifikant erhöht ($p = 0,6179$). Der Knockdown von MyD88 und der *Interferon Regulatory Factors* führt im Vergleich zu den Negativkontrollen zu etwa gleich hohen IL-1 β -Konzentrationen.

Die IFN- β -Sekretion hingegen war nach Knockdown von MyD88 im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erniedrigt ($p = 0,0500$). MyD88 scheint also in der Signalkaskade eine wesentliche Rolle zu spielen. Nach Knockdown von TRIF bzw. der *Interferon Regulatory Factors* kam es zu keiner signifikanten Änderung des IFN- β -Spiegels (Abbildung 28).

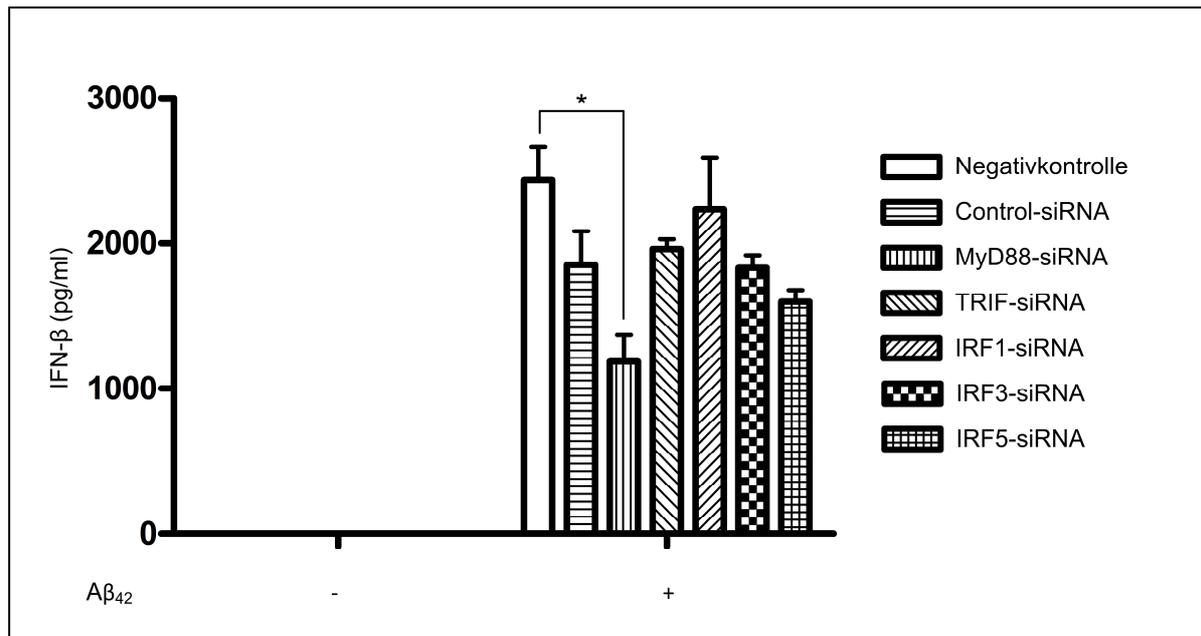


Abbildung 28: IFN- β -Sekretion nach Stimulation von HEK293 mit A β_{42} nach Knockdown von verschiedenen an der Signalkaskade beteiligten Adaptermolekülen und *Interferon Regulatory Factors*.

Primäre Keratinozyten wurden nach 2.4 mit MyD88-, TRIF-, IRF1-, IRF3- und IRF5-siRNA transfiziert und über 48 h inkubiert. Anschließend wurden sie über 2 h mit 40 μ M nach 2.3 vorbehandeltem A β_{42} stimuliert. Als Negativkontrollen dienten mit Wasser (NK) und mit Control-siRNA transfizierte Zellen. Die IFN- β -Konzentration im Zellüberstand wurde mittels IFN- β -ELISA gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten dargestellt. Die IFN- β -Sekretion ist nach Knockdown von MyD88 signifikant ($p = 0,0500$) erniedrigt. MyD88 ist also an der Vermittlung der Signalkaskade beteiligt. Der Knockdown von TRIF und der *Interferon Regulatory Factors* führt zu keiner signifikanten Änderung der IFN- β -Spiegel.

Abschließend lässt sich also feststellen, dass Beta-Amyloid in den Haarfollikeln von Acne inversa Patienten zu detektieren ist. Die Stimulation von primären Keratinozyten mit A β_{42} *in vitro* wirkt proinflammatorisch und führt sowohl zur Interleukin-1 β - als auch zur Interferon- β -Sekretion. Die IFN- β -Induktion ist sogar auf Gen-Ebene nachweisbar. Bei der IL-1 β -Freisetzung handelt es sich um aktiv sezerniertes Protein, da nachgewiesen werden konnte, dass Beta-Amyloid nicht toxisch auf Keratinozyten wirkt. Der genaue Mechanismus, der zur Zytokinfreisetzung führt, bleibt unklar, jedoch scheint das Adaptermolekül MyD88 wesentlich daran beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-1 β -Sekretion durch Beta-Amyloid NLRP3-, TLR2- und MMP-unabhängig erfolgt.

4 Diskussion

Die menschliche Haut ist täglich einer Vielzahl von Umweltfaktoren ausgesetzt. Hierzu verfügt sie über zahlreiche Abwehrmechanismen.

Zunächst bildet die Epidermis, insbesondere durch ihre oberste Schicht, die Hornschicht, eine Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen (Feldmeyer et al., 2010). Des Weiteren sind Keratinozyten eine wichtige Quelle antimikrobieller Peptide (AMP). Neben ihrer aktiven antimikrobiellen Wirkung fungieren AMPs als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems. Durch Stimulation von Keratinozyten führen sie zur Freisetzung multipler Chemokine und Zytokine und bewirken die Proliferation und Migration von Keratinozyten (Niyonsaba et al., 2007, Schaubert and Gallo, 2007). Außerdem verfügen Keratinozyten, wie auch andere Immunzellen, über diverse Abwehrmechanismen. An ihrer Plasmamembran sowie an intrazellulären Komponenten finden sich beispielsweise Toll-like Rezeptoren, die in der Lage sind, *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zu erkennen (Akira and Hemmi, 2003, Kawai and Akira, 2010). Das Binden eines für den jeweiligen TLR spezifischen Liganden führt über eine Signalkaskade zur Produktion von antimikrobiellen und antiviralen Zytokinen, Chemokinen und Peptiden sowie Typ I Interferonen (Kollisch et al., 2005, Lim and Staudt, 2013). Des Weiteren gibt es im Zellinneren so genannte NOD-like Rezeptoren, die bei Erkennen von intrazellulären Gefahrensignalen durch das Formen eines Inflammasomkomplexes ebenfalls in der Bildung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL-1 β und IL-18, resultieren (Bauernfeind et al., 2010).

Durch diese diversen Mechanismen sind Keratinozyten also in der Lage, eine lokale Entzündungsreaktion auszulösen und somit potentielle Gefahren zu bekämpfen.

4.1 Mögliche Ursachen der Inflammation bei Acne inversa

In der Literatur werden bei Acne inversa verschiedene Mutationen in der γ -Sekretase beschrieben (vgl. 1.6). Diese Protease führt gemeinsam mit der β -Sekretase durch Spaltung des Amyloid Precursor Proteins zur Entstehung von Amyloid β (vgl. 1.4.3). Pink et al. haben in ihrer Veröffentlichung von 2013 alle bisher entdeckten Mutationen zusammengefasst (Abbildung 29) (Pink et al., 2013).

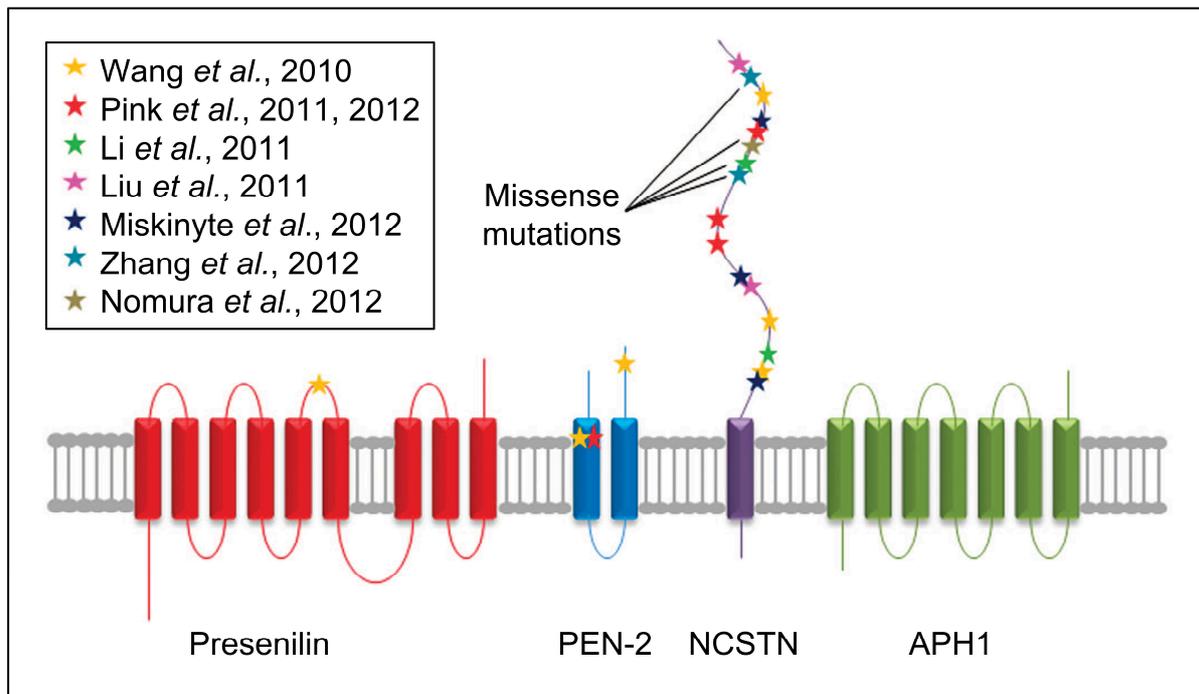


Abbildung 29: Lokalisation der Mutationen im γ -Sekretase Komplex bei Acne inversa.

Die bisher entdeckten Mutationen sind als Sterne abgebildet. Alle vier Missense Mutationen (p.V75I, p.D185N, p.P211R und p.Q216P) in NCSTN sind in der Ektodomäne lokalisiert (aus Pink et al., 2013).

Kelleher III et al. vermuten, dass bestimmte Mutationen der γ -Sekretase in einer Überproduktion von längeren Beta-Amyloid-Fragmenten resultieren. Falls sich diese in der Haut ablagern, könnte dadurch die Entzündungsreaktion bei Acne inversa ausgelöst werden (Kelleher and Shen, 2011).

Ein wichtiges am Entzündungsprozess beteiligtes proinflammatorisches Zytokin ist Interleukin-1 β . Es hat die Fähigkeit, die Expression von Adhäsionsmolekülen zu erhöhen. Zusammen mit der Induktion von Chemokinen fördert dies die Infiltration von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen und führt so zu einer örtlich begrenzten Inflammation. Des Weiteren fungiert IL-1 β als ein Co-Stimulator von T-Zell-Funktionen und spielt eine Rolle in der Antikörper-Produktion von B-Zellen (Dinarello, 2009, Contassot et al., 2012).

Aber auch Typ I Interferone, wie beispielsweise IFN- β , sind an der Immunantwort beteiligte Zytokine. Sie haben antivirale und immunmodulatorische Funktionen und sind in der Lage, die Reifung Antigen Präsentierender Zellen zu aktivieren und die Produktion von Zytokinen anzustoßen, die an der Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen beteiligt sind (Perry et al., 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Amyloid β in läsionaler Haut von Acne inversa Patienten vorkommt und ob dieses Peptid einen proinflammatorischen Effekt auf die Haut und insbesondere auf Keratinozyten hat.

In der Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass Beta-Amyloid in den Haarfollikeln von Acne inversa Läsionen vorhanden ist (vgl. 3.1.1/Abb. 11). Da diese Krankheit eine Erkrankung des terminalen Haarfollikels ist (Fimmel and Zouboulis, 2010), könnte in dieser Ablagerung die Ursache der Entzündung liegen. In der Kontrollhaut, einer Narbe, war dieses Peptid auch zu detektieren (vgl. 3.1.2/Abb. 12). Da eine Narbe allerdings einen fibrotischen Umbauprozess hinter sich hat, könnte die Ablagerung von A β dadurch zu erklären sein.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von primären Keratinozyten mit A β_{42} *in vitro* eine Interleukin-1 β -Sekretion zur Folge hat, die konzentrationsabhängig steigt und nach zwei Stunden ihr Maximum erreicht (vgl. 3.2.1/Abb. 13-16).

Inflammasomkomplexe, die pro-IL-1 β prozessieren und so zur Entstehung und Ausschüttung von aktivem IL-1 β führen, spalten auch pro-IL-18, welches dann ebenfalls in seiner aktiven Form IL-18 aus der Zelle freigesetzt wird (Strowig et al., 2012). In den Stimulationsversuchen mit Beta-Amyloid kam es jedoch zu keiner IL-18-Sekretion (vgl. 3.2.2).

Andere *pattern recognition receptors* (PRRs), wie beispielsweise Toll-like Rezeptoren (TLRs), führen neben der Produktion von Interleukinen auch zur Bildung von Typ I Interferonen (Kumar et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass eine Stimulation von primären Keratinozyten mit A β_{42} neben der IL-1 β -Sekretion auch eine IFN- β -Freisetzung zur Folge hat, die ebenfalls konzentrationsabhängig steigt und bereits nach einer Stunde ihr Maximum erreicht (vgl. 3.2.3/Abb. 17-18). Des Weiteren konnte diese Induktion von IFN- β auch auf Gen-Ebene nachgewiesen werden (vgl. 3.2.4/Abb. 19). Nach zwei Stunden war die relative Expression von IFN- β im Vergleich zur Negativkontrolle noch ähnlich hoch, nach sechs Stunden jedoch war sie etwa 6-fach erhöht. Im Gegensatz dazu war keine Induktion von IL-1 β auf RNA-Ebene nachzuweisen und auch IFN- α , IFN- γ und TNF- α zeigten sich unbeeinflusst (vgl. 3.2.4/Abb. 20).

Van der Zee et al. haben in ihren Untersuchungen herausgefunden, dass in der Haut von Acne inversa Patienten TNF- α , IL-1 β und IL-10 erhöht sind. Dabei korreliert der Spiegel der Zytokine mit der Schwere der Erkrankung. Auch in periläsionaler Haut waren noch erhöhte TNF- α -, IL-1 β - und IL-10 Spiegel zu detektieren (van der Zee et al., 2011).

Da in der vorliegenden Arbeit *in vitro* eine IL-1 β -Sekretion durch Amyloid β ausgelöst wurde, könnte die Entzündungsreaktion bei Acne inversa also durch eine erhöhte Zytokinproduktion in der Haut zustande kommen, hervorgerufen durch die Ablagerung von längeren Beta-Amyloid-Fragmenten in läsionaler Haut.

4.2 Kofaktoren mit möglichem Einfluss auf die Entzündung bei Acne inversa

Die Mutationen im Gen der γ -Sekretase haben in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung in der Pathogenese von Acne inversa bekommen (Pink et al., 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Hypothese, dass sich längere Beta-Amyloid-Fragmente in der Haut der Patienten ablagern, gezeigt, dass Beta-Amyloid in Keratinozyten eine proinflammatorische Reaktion auslöst, die in der Sekretion von IL-1 β und IFN- β resultiert (vgl. 3.2.1/Abb. 13-16; vgl. 3.2.3/Abb. 17-18).

Neben der genetischen Prädisposition gibt es allerdings weitere Komorbiditäten bzw. Risikofaktoren für die Entstehung der Erkrankung. So sind beispielsweise etwa 90 % der Betroffenen Raucher, weshalb Rauchen als einer der hauptursächlichen Faktoren gesehen wird (Happle and König, 2011).

Aber auch das metabolische Syndrom spielt eine wichtige Rolle. Die Prävalenz des metabolischen Syndroms ist bei Acne inversa Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht. Die Hypothese, dass die chronische Entzündung bei der Erkrankung die metabolischen Veränderungen begünstigt und fördert, konnte nicht bestätigt werden. Deshalb vermutet man, dass das metabolische Syndrom eine primäre pathologische Erscheinung sein könnte, die Acne inversa triggert (Sabat et al., 2012).

Pattern recognition receptors (PRRs) können exzessive Nahrungsaufnahme als gefährlich ansehen und daraufhin Immunantworten aktivieren, was in erhöhten

zirkulierenden Zytokinen und der Rekrutierung von Immunzellen resultiert. Letztendlich entsteht dadurch ein Zustand geringgradiger chronischer Inflammation. Dies wiederum fördert die Entwicklung von Insulinresistenz und trägt zur Entstehung metabolischer Komplikationen bei (de Heredia et al., 2012, Jin and Flavell, 2013).

Des Weiteren findet sich in adipösen Individuen eine erhöhte Expression der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 sowie ihres Adaptermoleküls MyD88 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) sowie im subkutanen Fettgewebe. Die TLR-Expression korreliert dabei mit der erhöhten Expression von inflammatorischen Zytokinen (Ahmad et al., 2012).

Wie bereits unter 4.1 erwähnt, finden sich in läsionaler Haut von Acne inversa Patienten ebenfalls erhöhte Spiegel an Zytokinen. Dabei sind vor allem TNF- α , IL-1 β und IL-10 erhöht, wohingegen IL-22 und IL-20 erniedrigt sind. Des Weiteren sind auch antimikrobielle Peptide in Acne inversa Läsionen erniedrigt (van der Zee et al., 2011, Wolk et al., 2011). Zudem wurde dort eine erhöhte Anzahl an TLR2-exprimierenden Makrophagen entdeckt (Fimmel and Zouboulis, 2010).

Da die Erhöhung des Zytokinspiegels sowie die erhöhte TLR2-Expression zum Teil mit den Erkenntnissen bei Adipositas übereinstimmen, könnte dies erklären, weshalb Adipositas als Risikofaktor für die Entstehung von Acne inversa gilt.

4.3 Mechanismen der Inflammation durch Amyloid β bei Alzheimer

Aufgrund der großen Bedeutung von Beta-Amyloid in der Pathogenese von Alzheimer sind die Mechanismen der inflammatorischen Wirkung dieses Peptids vor allem in seiner Wirkung auf das Gehirn untersucht.

Morbus Alzheimer ist die häufigste Form der Demenz. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch langsamen progredienten Gedächtnisverlust und Orientierungsstörungen (Masuhr, 2007). Typischerweise kommt es bei Alzheimer im Gehirn extrazellulär zu einer Ablagerung von Amyloid- β -Plaques und intrazellulär zu einer Akkumulation von Neurofibrillen (Cappellano et al., 2013). Dabei kommt es durch fibrilläres Beta-Amyloid zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen, die im Gehirn als primäre Immun-Effektor-Zellen fungieren (Mandrekar-Colucci and Landreth, 2010). Auch bei Alzheimer sind Mutationen in den Presenilin-Genen PSEN1 und PSEN2 beschrieben, die mit einem frühzeitigen Beginn der Erkrankung assoziiert

sind und durch die Veränderung in der γ -Sekretase zur Produktion größerer Mengen Amyloid β führen (Cappellano et al., 2013).

Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Akkumulation von Beta-Amyloid eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Alzheimer spielt. Mikrogliazellen werden dadurch aktiviert, phagozytieren Amyloid β und sezernieren Zytokine (Halle et al., 2008). Eines dieser Zytokine ist Interleukin-1 β . Im Maus Modell wurde eine höhere Expression von IL-1 β in Mikrogliazellen, die Amyloid-Plaques umgeben, nachgewiesen (Simard et al., 2006). Außerdem konnten höhere Konzentrationen dieses Zytokins im Liquor von Patienten mit dieser Erkrankung detektiert werden (Blum-Degen et al., 1995). Eine Stimulation von Gliazellen mit A β *in vitro* bestätigte, dass IL-1 β von aktivierten Mikrogliazellen sezerniert wird (Akama and Van Eldik, 2000).

In der Alzheimer-Forschung wurden verschiedene Mechanismen entdeckt, die in Mikrogliazellen zur Interleukin-1 β -Sekretion führen.

Zum einen ist das NLRP3-Inflammasom für die IL-1 β -Produktion verantwortlich. Dabei wird Amyloid β von den Mikrogliazellen zunächst phagozytiert und in Lysosomen eingeschlossen. Anschließend kommt es zu lysosomaler Schwellung, Destabilisierung und Integritätsverlust, was wiederum dazu führt, dass lysosomale Inhalte, darunter Cathepsin B, in das Zytoplasma freigesetzt werden. Die anschließende NLRP3-Aktivierung wird mit Cathepsin B in Verbindung gebracht. Dabei lagert sich NLRP3 über das Adaptermolekül ASC mit pro-Caspase-1 zusammen, wobei aktive Caspase-1 entsteht, welches in der Lage ist, pro-IL-1 β in bioaktives IL-1 β umzuwandeln (Halle et al., 2008).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass es in Keratinozyten durch Stimulation mit A β_{42} nicht zu einer NLRP3-Aktivierung kommt. Auch nach Knockdown von ASC und Caspase-1 zeigte sich die IL-1 β -Sekretion unbeeinflusst (vgl. 3.4.1/Abb. 24). Die Zytokinproduktion in primären Keratinozyten erfolgt dementsprechend wohl über einen anderen Mechanismus.

Halle et al. haben erkannt, dass für die IL-1 β -Freisetzung eine fibrilläre Konformation von Beta-Amyloid benötigt wird. Ein möglicher Mechanismus der NLRP3-Aktivierung könnte also die physikalische Struktur des Aktivators sein (Halle et al., 2008).

In den Stimulationsversuchen mit Keratinozyten wurde hingegen mit A β -Monomeren gearbeitet, da hierbei eine stärkere IL-1 β -Sekretion zu beobachten war. Welche Form von Beta-Amyloid sich bei Mutationen im Gen der γ -Sekretase in der Haut ablagert, ist bisher unbekannt.

Aber auch die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 spielen eine Rolle in der inflammatorischen Wirkung von Beta-Amyloid bei Alzheimer (Udan et al., 2008).

Nach Knockdown von TLR2 in Mikrogliazellen und Makrophagen kommt es durch die Stimulation mit A β_{42} zu einer signifikant erniedrigten IL-1 β - und TNF- α -Sekretion. TLR2 fungiert dabei als primärer Rezeptor für A β -Aggregate. Die Entzündungsantwort wird durch die Koexpression von TLR1 verstärkt und durch TLR6-Koexpression erniedrigt. Außerdem steigert das Fehlen von TLR2 die Phagozytose von Beta-Amyloid (Liu et al., 2011a).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Signalweg über TLR2 nicht nachgewiesen werden. Nach Knockdown von TLR2 kam es bei der anschließenden Stimulation von Keratinozyten mit A β_{42} *in vitro* zu keiner Reduktion in der IL-1 β -Sekretion (vgl. 3.4.3/Abb. 26).

Die Beteiligung von TLR4 an der A β -vermittelten inflammatorischen Wirkung wurde in Mikrogliazellen aus TLR4-Knockdown-Mäusen und in humanen Monozyten nach Inhibition von TLR4 nachgewiesen. Dabei ist für die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine die Integrität des trimolekularen Rezeptorkomplexes aus TLR4, MD-2 (*Myeloid Differentiation Protein 2*) und CD14 (*cluster of differentiation 14*) notwendig (Walter et al., 2007).

Der Grund für die Beteiligung der zwei Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 könnte der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Rezeptor CD14 sein, der mit fibrillärem A β_{42} interagiert und so eine inflammatorische Wirkung herbeiführt. CD14 scheint für die Ligandenbindung und Präsentation an TLR2 und TLR4 verantwortlich zu sein. Udan et al. vermuten des Weiteren, dass multiple TLRs mit fibrillärem Beta-Amyloid interagieren könnten (Udan et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Knockdown-Versuche mit TLR4 durchgeführt. Es ist also Aufgabe zukünftiger Arbeiten, diesen möglichen Signalweg auszuschließen. Dabei sollte zudem ein kombinierter Knockdown von TLR2 und TLR4 erfolgen, da es sein könnte, dass bei Inhibition eines Toll-like Rezeptors der

andere TLR in der Lage ist, dies zu kompensieren (Udan et al., 2008). Außerdem sollte die Beteiligung weiterer TLRs untersucht werden.

4.4 Mögliche Mechanismen der Inflammation durch Amyloid β in Keratinozyten

Neben den bei Alzheimer entdeckten Mechanismen der IL-1 β -Sekretion durch Inflammasome oder Toll-like Rezeptoren gibt es auch alternative Mechanismen der IL-1 β -Prozessierung. Aus Neutrophilen und Makrophagen stammende Serinproteasen, wie Poteinase-3, Elastase und Cathepsin-G, sind in der Lage, pro-IL-1 β in aktives IL-1 β zu prozessieren (Netea et al., 2010). Aber auch die Matrix-Metalloproteinasen Stromelysin-1 (MMP-3), Gelatinase A (MMP-2) und B (MMP-9) sind dazu imstande, bioaktives Interleukin-1 β zu produzieren. Dabei führt Stromelysin-1 bereits nach einer Stunde zur Entstehung von aktivem IL-1 β , dessen biologische Aktivität allerdings nach 8 – 24 Stunden wieder abnimmt (Schonbeck et al., 1998).

Da die IL-1 β -Sekretion in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ebenfalls sehr schnell, nämlich bereits nach zwei Stunden, erfolgte, sollte eine Prozessierung durch Matrix-Metalloproteinasen ausgeschlossen werden. Hierzu wurden primäre Keratinozyten nach Inhibition von MMPs mit A β_{42} stimuliert. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte jedoch keine Reduktion in der IL-1 β -Freisetzung festgestellt werden (vgl. 3.4.2/Abb. 25). Die IL-1 β -Prozessierung erfolgt also MMP-unabhängig.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Interleukin-1 β -Sekretion in Keratinozyten weder über NLRP3, noch über TLR2 zustande kommt. Auch Matrix-Metalloproteinasen sind daran unbeteiligt.

Um weitere Mechanismen der A β -vermittelten Zytokinausschüttung zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein Teil der den Toll-like Rezeptoren nachgeschalteten Signalwege überprüft. Hierzu wurden die zwei Adaptermoleküle MyD88 und TRIF sowie die *Interferon Regulatory Factors* IRF1, IRF3 und IRF5 mittels Knockdown ausgeschaltet und nach Stimulation mit A β_{42} wurde sowohl die IL-1 β - als auch die IFN- β -Sekretion gemessen.

Obwohl MyD88 an der Signaltransduktion vieler TLRs beteiligt ist, die zur Produktion von IL-1 β führen (vgl. 1.2.1/Tabelle 1), zeigt sich die IL-1 β -Produktion MyD88-unabhängig (vgl. 3.4.4/Abb. 27). Dahingegen ist die IFN- β -Sekretion MyD88-abhängig. Nach Knockdown von MyD88 kam es im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer signifikant erniedrigten IFN- β -Ausschüttung (vgl. 3.4.4/Abb. 28).

Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) ist eines von fünf Adaptermolekülen, die von TLRs für die Aktivierung der sich anschließenden Signalkaskade rekrutiert werden (Gay and Gangloff, 2007). MyD88 besteht aus einer Death Domäne am NH₂-Ende und einer Toll/IL-1R (TIR) Domäne am COOH-Ende (Warner and Nunez, 2013). Es wird von allen TLRs außer TLR3 als Adaptermolekül benutzt. Während die membranständigen Toll-like Rezeptoren TLR1/2, TLR2/6, TLR4 und TLR5 über MyD88 lediglich zur Produktion inflammatorischer Zytokine führen, können die endosomal lokalisierten Toll-like Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR9 über MyD88 zusätzlich Typ I Interferone produzieren. TLR4 ist ebenfalls zur Produktion von Typ I Interferonen in der Lage, der Signalweg führt allerdings über die Adaptermoleküle TRAM und TRIF. TLR3 führt MyD88-unabhängig über TRIF zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Typ I Interferonen (Brown et al., 2011). Allerdings ist hieran nicht nur das Adaptermolekül TRIF beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die TLR3-vermittelte IFN- β -Sekretion negativ durch *MyD88 adaptor-like* (Mal)/*Toll-IL-1 adaptor protein* (TIRAP) reguliert wird. Das Fehlen von Mal/TIRAP bewirkt also eine höhere IFN- β -Sekretion, da die Inhibition des Signalwegs aufgehoben wurde (Siednienko et al., 2010).

MyD88 ist also ein sehr wichtiges Adaptermolekül in der Signalvermittlung von Toll-like Rezeptoren. Die durch MyD88 ausgelösten intrazellulären Signalwege, die letztendlich zur Transkription von inflammatorischen Zytokinen und Typ I Interferonen führen, sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 30).

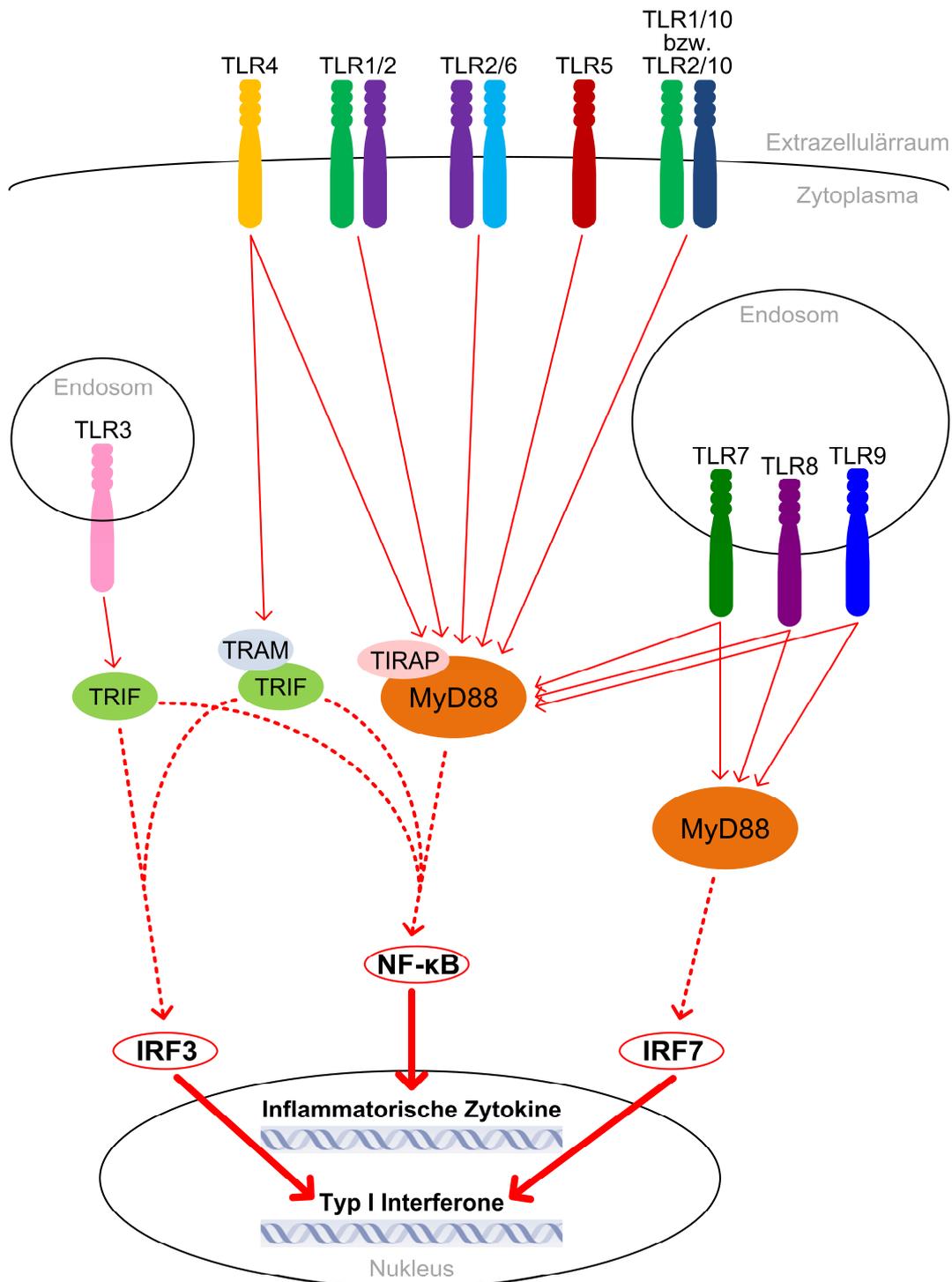


Abbildung 30: Intrazelluläre Signalwege von Toll-like Rezeptoren.

Die Toll-like Rezeptoren TLR1/2, TLR2/6, TLR5 und TLR1/10 bzw. TLR2/10 führen über die Adaptermoleküle MyD88 und TIRAP zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und somit zur Transkription von proinflammatorischen Zytokinen. TLR 4 aktiviert ebenfalls diesen Signalweg und führt zusätzlich über TRIF/TRAM zur Aktivierung von IRF3 und somit zur Transkription von Typ I Interferonen. TLR7, TLR8 und TLR9 führen über MyD88 sowohl zur Aktivierung von NF-κB und zur Transkription von proinflammatorischen Zytokinen als auch zur Aktivierung von IRF7, was eine Typ I Interferon-Produktion zur Folge hat. TLR3 nutzt als einziger Toll-like Rezeptor nicht MyD88 als Adaptermolekül, sondern führt über TRIF zur Aktivierung von IRF3 und zur Transkription von Typ I Interferonen. Gleichzeitig wird über TRIF NF-κB aktiviert, was eine Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge hat (adaptiert nach Brown et al., 2011).

In der Alzheimer-Forschung hat das Fehlen von MyD88 ebenfalls Folgen. Die Rekrutierung und Aktivierung von Mikrogliazellen durch exogenes fibrilläres Beta-Amyloid war *in vivo* in MyD88-defizienten Mäusen niedriger als in Wildtyp-Mäusen (Halle et al., 2008). Zudem war die A β -Ablagerung im Gehirn geringer als in Kontrollen (Lim et al., 2011). Außerdem erhöht das Fehlen von MyD88 die Phagozytose von aggregiertem Amyloid β in Makrophagen (Hao et al., 2011). In Mikrogliazellen und Makrophagen konnte die vermehrte Phagozytose von Beta-Amyloid ebenfalls nach Ausschalten von TLR2 beobachtet werden (Liu et al., 2011a). Aber auch nach Aktivierung der Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR9 ist die A β -Phagozytose erhöht (Hao et al., 2011).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde der Einfluss des Adaptermoleküls MyD88 auf die Phagozytose von Beta-Amyloid nicht untersucht. Auch ist unklar, ob Amyloid β in Keratinozyten überhaupt phagozytiert wird oder ob der Mechanismus der Signaltransduktion über einen membranständigen Rezeptor läuft. Dies zu untersuchen, bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

Auch der Mechanismus, über den Beta-Amyloid in primären Keratinozyten zu einer Interleukin-1 β - und Interferon- β -Sekretion führt, bleibt unklar. Zwar wurde MyD88 als entscheidender Faktor für die IFN- β -Produktion nachgewiesen, wo er allerdings in den Signalweg eingreift, ist nicht klar.

Die Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 führen zwar zu einer IFN- β -Induktion, allerdings nicht über MyD88, sondern über die Adaptermoleküle TRIF bzw. TRAM/TRIF (Kawai and Akira, 2006).

Auch die endosomal lokalisierten Toll-like Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR9 führen zu einer Interferon- β -Induktion. Diese ist MyD88-abhängig (Brown et al., 2011). Dieser Weg könnte somit der entscheidende Mechanismus sein. Da über diese TLRs allerdings ebenfalls MyD88-abhängig Interleukin-1 β induziert wird, bleibt unklar, warum sich die IL-1 β -Sekretion nach Knockdown von MyD88 unbeeinflusst zeigt. Jedoch ist es möglich, dass IL-1 β über mehrere Mechanismen produziert wird, von denen einer MyD88-unabhängig ist und somit die Blockierung des Signalwegs von TLR7, TLR8 oder TLR9 kompensiert. Beispielsweise könnte ein weiteres Inflammasom eine Rolle spielen, wobei der entsprechende NOD-like Rezeptor ohne

das Adaptermolekül ASC mit einer anderen proinflammatorischen Caspase, beispielsweise Caspase-5, einen Komplex bildet, der zur IL-1 β -Produktion führt.

Ähnlich wie die TLR3-vermittelte IFN- β -Produktion negativ von dem Adaptermolekül Mal/TIRAP reguliert wird, ist auch vorstellbar, dass MyD88 einen anderen IFN- β -Signalweg positiv beeinflusst. Nach Ausschaltung von MyD88 käme es dann zu einer Inhibition des Signalwegs und somit zu einer geringeren IFN- β -Sekretion.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Interferon- β -Signalweg über einen membranständigen Rezeptor läuft und die Interleukin-1 β -Induktion intrazellulär beginnt. Falls das Fehlen von MyD88 in Keratinozyten ebenfalls eine erhöhte Phagozytose zur Folge hat, wäre extrazellulär weniger Amyloid β vorhanden, das an den membranständigen Rezeptor binden könnte. Der intrazelluläre Signalweg bleibt hingegen unbeeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit können also nur Hypothesen und Vermutungen aufgestellt werden, über welchen Signalweg Beta-Amyloid eine proinflammatorische Wirkung in Keratinozyten hervorruft. Den genauen Mechanismus herauszufinden, bleibt somit Aufgabe zukünftiger Forschungsarbeiten.

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Mechanismus der Zytokinproduktion durch A β ein anderer ist als im Gehirn. In Keratinozyten erfolgt der Signalweg im Gegensatz zu dem in Mikrogliazellen NLRP3- und TLR2-unabhängig.

4.5 Klinische Relevanz

Um Krankheiten zufriedenstellend therapieren zu können, muss der Pathomechanismus, der zu dieser Erkrankung führt, entschlüsselt werden. Bei Acne inversa ist die genaue Ätiopathogenese unklar, jedoch konnten einige mögliche Therapieoptionen gefunden werden (Rambhatla et al., 2012).

Ein Therapieansatz ist das Mendonça-Schema. Dies ist eine 10-wöchige Therapie mit 300 mg Rifampicin zweimal täglich und 300 mg Clindamycin zweimal täglich (Mendonca and Griffiths, 2006). Da Acne inversa eine inflammatorische Erkrankung mit bakterieller Superinfektion ist, wird vermutet, dass die Effektivität dieser Therapie durch die sowohl antibakteriellen als auch antientzündlichen Eigenschaften der Antibiotika zu erklären ist (Gener et al., 2009).

Wie in einigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, kommt es bei Acne inversa zu einer Veränderung der Zytokinspiegel in der Haut. Sowohl in läsionaler als auch in periläsionaler Haut sind die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α erhöht (van der Zee et al., 2011). Eine weitere Therapiemöglichkeit ist deshalb die Behandlung mit den TNF- α -Inhibitoren Infliximab (Remicade[®]), Etanercept (Enbrel[®]) oder Adalimumab (Humira[®]) (Haslund et al., 2009). Die meisten Erkrankten profitieren von Infliximab, wobei dieses Medikament vor allem bei Patienten mit dominierender inflammatorischer Komponente wirksam zu sein scheint (Mekkes and Bos, 2008, Haslund et al., 2009). Die Monotherapie mit Etanercept wird zwar in einigen Studien als geeignet beschrieben, jedoch gibt es auch gegenteilige Studienergebnisse, in denen die Effektivität der Therapie klinisch nicht signifikant ist (Haslund et al., 2009, Lee et al., 2009, Adams et al., 2010). Adalimumab hat sich in mehreren Untersuchungen während der Therapie als wirksam erwiesen, nach Absetzen kommt es allerdings häufig zum Rezidiv (Haslund et al., 2009, Miller et al., 2011).

Die Therapie mit TNF- α -Inhibitoren führt also häufig zu einer Verbesserung der Erkrankung, allerdings ist damit keine Heilung zu erzielen. Ein sinnvoller Einsatz scheint jedoch die Reduktion der notwendigen chirurgischen Eingriffe zu sein (Wollina et al., 2013).

Die chirurgische Sanierung ist häufig die letzte Maßnahme, falls jegliche Therapieveruche mit Medikamenten gescheitert sind. Jedoch kommt es auch hierbei häufig zum Rezidiv. Dies ist vielleicht durch die in periläsionaler Haut ebenfalls erhöhten Zytokinspiegel zu erklären. Deshalb ist nur die großzügige chirurgische Exzision Erfolg versprechend (van der Zee et al., 2011).

All diese aufgeführten Therapieoptionen verschaffen zwar oft Besserung, sind jedoch nicht immer wirksam bzw. führen häufig zum Rezidiv. Deshalb ist es wichtig, den genauen Pathomechanismus dieser Erkrankung weiter zu erforschen, um dort gezielt therapeutisch ansetzen zu können.

Falls, wie in dieser Arbeit angenommen, eine Ablagerung von Beta-Amyloid die Ursache der Inflammation bei Acne inversa ist, könnte hier also der zukünftige Ansatzpunkt der Therapie liegen.

Auch eine Hemmung des entstehenden Interleukin-1 β erscheint sinnvoll. Der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra ist derzeit bereits in einigen klinischen Studien als mögliche Therapie für Acne inversa in Erprobung (Braun-Falco et al., 2012).

Aber auch eine Inhibition der defekten γ -Sekretase wäre denkbar. Da diese Protease jedoch auch andere Proteine spaltet, hat eine Hemmung nicht nur Einfluss auf die Beta-Amyloid-Produktion (Vardy et al., 2005). Es könnte zu ungewollten Konsequenzen kommen, weshalb auch hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Mutationen im Gen der γ -Sekretase bei Acne inversa. Da diese Protease für die Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP) verantwortlich ist und somit zur Entstehung von Beta-Amyloid führt, könnte ein Defekt der γ -Sekretase eine fehlerhafte Synthese von Amyloid β zur Folge haben.

Auch bei Morbus Alzheimer sind Mutationen in der γ -Sekretase beschrieben. Bei dieser Erkrankung kommt es dadurch zur Überproduktion längerer A β -Fragmente, nämlich A β_{42} und A β_{43} , die sich im Gehirn ablagern.

Da Amyloid Precursor Protein auch in der Haut exprimiert wird, könnte es durch eine Mutation in der γ -Sekretase zur Ablagerung der vermehrt produzierten, längeren A β_{42} -Fragmente in der Haut kommen, was die für Acne inversa charakteristische Entzündungsreaktion hervorruft.

Aufgabe dieser Arbeit war es deshalb, zu überprüfen, ob Beta-Amyloid in läsionaler Haut von Acne inversa Patienten nachweisbar ist. Da die Folgen einer Ablagerung dieses Peptids in der Haut unbekannt sind, sollte außerdem untersucht werden, ob A β einen proinflammatorischen Effekt auf die Zellen der Haut hat und über welchen Mechanismus diese Reaktion ausgelöst wird.

Die Versuche erfolgten mit primären humanen epidermalen Keratinozyten (HEKn).

Untersuchungsmethoden dieser Arbeit waren *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (IL-1 β -ELISA, IL-18-ELISA und IFN- β -ELISA), semi-quantitative Real-Time PCR, Zytotoxizitäts-Assays (WST-1-Assay, Kritallviolett-Assay und BrdU-Assay) sowie immunhistochemische Färbungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass in den Haarfollikeln läsionaler Haut von Acne inversa Patienten Beta-Amyloid nachzuweisen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass exogenes A β_{42} in primären humanen epidermalen Keratinozyten *in vitro* eine inflammatorische Reaktion auslöst. Dabei kommt es zur IL-1 β - sowie zur IFN- β -Sekretion, jedoch nicht zur IL-18-Produktion. Die IFN- β -Induktion konnte mittels semi-quantitativer Real-Time PCR auch auf Gen-Ebene nachgewiesen werden. Die vermehrte IL-1 β -Produktion ist nicht auf eine zytotoxische Wirkung von Amyloid β zurückzuführen. Im Gegensatz zum Mechanismus der Zytokinproduktion in Mikrogliazellen bei Alzheimer, erfolgt die IL-1 β -Sekretion in

Keratinozyten NLRP3- und TLR2-unabhängig. Auch Matrix-Metalloproteinasen sind daran unbeteiligt. Das Adaptermolekül MyD88 scheint allerdings eine Rolle bei der IFN- β -Sekretion zu spielen, die IL-1 β -Produktion zeigt sich hingegen MyD88-unabhängig.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Mutationen im Gen der γ -Sekretase durch die Ablagerung von Beta-Amyloid in der Tat für die Entzündung bei Acne inversa verantwortlich sein könnten. Der genaue Mechanismus, der zu dieser inflammatorischen Reaktion führt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur in Ansätzen geklärt werden und bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

Die klinische Relevanz dieser Forschung wird deutlich, wenn man die zahlreichen Therapieoptionen bei Acne inversa betrachtet, die zwar zu einer Besserung führen können, jedoch keine Heilung erzielen. Durch die häufige Therapieresistenz haben die Patienten einen sehr hohen Leidensdruck. Deshalb ist es umso wichtiger, den genauen Pathomechanismus dieser Erkrankung weiter zu verstehen und zu entschlüsseln, um neue Therapieansätze zu finden, die gezielt dort ansetzen, wo die Krankheit entsteht. So ist es vielleicht sogar möglich, bei familiärer Acne inversa das Auftreten der Erkrankung bei Mutationsträgern vor der Entstehung zu verhindern.

6 Abkürzungsverzeichnis

*	signifikant ($p \leq 0,05$)
**	sehr signifikant ($p \leq 0,01$)
***	hochsignifikant ($p \leq 0,001$)
+	mit (Stimulation mit A β_{42})
-	ohne (Stimulation mit A β_{42})
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A β	Amyloid beta
A β_{25-35}	Aminosäuren 25-35 von Amyloid beta
A β_{40}	40 Aminosäuren langes Amyloid beta
A β_{42}	42 Aminosäuren langes Amyloid beta
A β_{43}	43 Aminosäuren langes Amyloid beta
Abb.	Abbildung
AI	Acne inversa
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
AMP(s)	Antimikrobielle(s) Peptid(e)
Anti-BrdU-POD	Antikörper gegen Bromdesoxyuridin, dessen Fab (<i>fragment-antigen-binding</i>)-Fragment mit Peroxidase konjugiert ist
APH1	<i>Anterior Pharynx Defective 1</i>
APP	Amyloid Precursor Protein
APP695, APP751, APP770	Isoformen von APP, die durch alternatives Spleißen entstehen
ARM	<i>Armadillo</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein</i>
BIR	<i>Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise

C83	C-terminales Peptidfragment, das bei der Spaltung von APP durch die α -Sekretase entsteht
Ca ²⁺	Calcium
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	Circulardichroismus
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLR(s)	C-Typ Lectin Rezeptor(en)
cm ²	Quadratzenimeter
COOH	Carboxygruppe
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAMP(s)	<i>danger-associated molecular pattern(s)</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DD	<i>death-fold domain</i>
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (dt.: Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
ds	<i>double-stranded</i> (dt.: doppelsträngig)
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDGS	EpiLife [®] <i>defined growth supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAM	Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)

g	Erdbeschleunigung ($g_n = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
HCl	Hydrogenchlorid
HEAT	<i>huntingtin, elongation factor 3 (EF3), PR65/A subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), lipid kinase TOR</i>
HEKn	<i>Human Epidermal Keratinocytes, neonatal</i>
HIN200	<i>hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ICE	<i>IL-1-converting enzyme</i>
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alpha
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IRF(s)	<i>Interferon Regulatory Factor(s)</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LAM	Lipoarabinomannan
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
LPS	Lipopolysaccharid

M	molar
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i>
Mal/TIRAP	<i>MyD88 adaptor-like/Toll-Interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein</i>
MD-2	<i>Myeloid Differentiation Protein 2</i>
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MMP-2	Gelatinase A (Matrix-Metalloproteinase 2)
MMP-3	Stromelysin-1 (Matrix-Metalloproteinase 3)
MMP-9	Gelatinase B (Matrix-Metalloproteinase 9)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (dt.: Boten-RNA)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
µl/well	Mikroliter pro <i>well</i>
µM	mikromolar
Na-Citrat	Natriumcitrat
NACHT	NAIP (<i>neuronal apoptosis inhibitor protein</i>), C2TA (<i>MHC class 2 transcription activator</i>), HET-E (<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>) und TP1 (<i>telomerase-associated protein</i>)
NAD	<i>NACHT-associated domain</i>
NBD	<i>nucleotide-binding domain</i>
NCT bzw. NCSTN	Nicastrin
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NH ₂	Aminogruppe

NK	Negativkontrolle
NLR(s)	NOD-like Rezeptor(en)
NLRA	NLR mit <i>acidic activation domain</i>
NLRB	NLRs mit BIR <i>domain</i>
NLRC	NLRs mit einer <i>caspase recruitment domain</i>
NLRP	NLRs mit einer <i>pyrin domain</i>
NLRX	NLR-Familie mit keiner strengen Homologie zur N-terminalen Domäne eines Mitglieds einer anderen NLR-Subfamilie
nm	Nanometer
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p	p-Wert (Signifikanzwert) (engl.: <i>p-value</i> von <i>probability</i>)
p3	Peptid, das bei der Spaltung von APP durch die α - und γ -Sekretase entsteht (Aminosäuren 17-40 bzw. 17-42 von A β)
p10- bzw. p20-Untereinheit	10 kDa bzw. 20 kDa Untereinheit von Caspase-1
PAMP(s)	<i>pathogen-associated molecular pattern(s)</i>
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit 0,05 % Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (dt.: Polymerasekettenreaktion)
PEN2	<i>Presenilin Enhancer 2</i>
pdAdT bzw. poly(dA:dT)	poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic)
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
POD	<i>peroxidase</i>
pro-Caspase-1	Vorstufe der aktiven Caspase-1
pro-IL-18	Vorstufe des biologisch aktiven IL-18
pro-IL-1 β	Vorstufe des biologisch aktiven IL-1 β

pro-IL-33	Vorstufe des biologisch aktiven IL-33
PRR(s)	<i>pattern recognition receptor(s)</i>
PSEN1	Gen, das für Presenilin-1 kodiert
PSEN2	Gen, das für Presenilin-2 kodiert
PYD	<i>pyrin domain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (dt.: Ribonukleinsäure, RNS)
RLR(s)	RIG-I-like Rezeptor(en)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
sAPP	sekretorische N-terminale Domäne von APP
sAPP α	sekretorische N-terminale Domäne von APP, die durch Spaltung durch die α -Sekretase entsteht
sAPP β	sekretorische N-terminale Domäne von APP, die durch Spaltung durch die β -Sekretase entsteht
SARM	<i>sterile alpha- and HEAT/Armadillo-containing Protein</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
ss	<i>single-stranded</i> (dt.: einzelsträngig)
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR(s)	Toll-like Rezeptor(en)
TLR1/2	Dimer aus TLR1 und TLR2
TLR1/10	Dimer aus TLR1 und TLR10
TLR2/6	Dimer aus TLR2 und TLR6
TLR2/10	Dimer aus TLR2 und TLR10
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TR	Transfektionsreagenz
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor-inducing Interferon-β</i>
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
U/min	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
WST-1	<i>water soluble tetrazolium</i>

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopische Struktur der Haut.....	2
Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege.	6
Abbildung 3: Formation eines Inflammasomkomplexes.....	9
Abbildung 4: Spaltungsstellen von pro-IL-1 β	11
Abbildung 5: Transmissionselektronenmikroskopie verschiedener A β ₄₂ - Konformationen.	13
Abbildung 6: Prozessierung von Amyloid Precursor Protein.....	15
Abbildung 7: Schematische Skizze verschiedener Konformationen von Beta-Amyloid.	16
Abbildung 8: Phasentrennung zur RNA-Isolation.	25
Abbildung 9: Polymerase-Kettenreaktion.....	27
Abbildung 10: IL-1 β -ELISA.	31
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von Acne inversa Hautproben.....	38
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von Kontrollhaut (Narbe).....	39
Abbildung 13: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ – mit und ohne Transfektion (TR = Transfektionsreagenz).	41
Abbildung 14: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ – Zeitkinetik...	42
Abbildung 15: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ – Konzentrationsreihe.....	43
Abbildung 16: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ – mit und ohne Vorstimulation mit TNF- α und IFN- γ	44
Abbildung 17: IFN- β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ – Konzentrationsreihe.....	45
Abbildung 18: IFN- β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ – Zeitkinetik...	46
Abbildung 19: Relative Expression von IFN- β in HEK _n nach 2 h bzw. 6 h Stimulation mit A β ₄₂	47
Abbildung 20: Relative Expression von IFN- α , IFN- γ , TNF- α und pro-IL-1 β in HEK _n nach 2 h bzw. 6 h Stimulation mit A β ₄₂	47
Abbildung 21: WST-1-Assay nach zweistündiger Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂	48
Abbildung 22: Kristallviolett-Assay nach zweistündiger Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂	49

Abbildung 23: BrdU-Assay nach zweistündiger Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂	50
Abbildung 24: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ nach Knockdown von NLRP3, ASC und Caspase-1.....	52
Abbildung 25: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ nach Inhibition von MMP.	53
Abbildung 26: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ nach Knockdown von TLR2.....	54
Abbildung 27: IL-1 β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ nach Knockdown von verschiedenen an der Signalkaskade beteiligten Adaptermolekülen und <i>Interferon Regulatory Factors</i>	56
Abbildung 28: IFN- β -Sekretion nach Stimulation von HEK _n mit A β ₄₂ nach Knockdown von verschiedenen an der Signalkaskade beteiligten Adaptermolekülen und <i>Interferon Regulatory Factors</i>	57
Abbildung 29: Lokalisation der Mutationen im γ -Sekretase Komplex bei Acne inversa.	59
Abbildung 30: Intrazelluläre Signalwege von Toll-like Rezeptoren.	67
Tabelle 1: Die verschiedenen TLRs und ihre Eigenschaften.	6
Tabelle 2: Diagnostische Kriterien der Acne inversa.	17
Tabelle 3: Hurley-Klassifikation.	17
Tabelle 4: Sequenzen der zur Transfektion verwendeten siRNAs.....	23
Tabelle 5: Sequenzen der zur semi-quantitativen Real-Time PCR verwendeten Primer.....	28

8 Literaturverzeichnis

- ADAMS, D. R., YANKURA, J. A., FOGELBERG, A. C. & ANDERSON, B. E. 2010. Treatment of hidradenitis suppurativa with etanercept injection. *Arch Dermatol*, 146, 501-4.
- AHMAD, R., AL-MASS, A., ATIZADO, V., AL-HUBAIL, A., AL-GHIMLAS, F., AL-AROUJ, M., BENNAKHI, A., DERMIME, S. & BEHBEHANI, K. 2012. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J Inflamm (Lond)*, 9, 48.
- AHMED, M., DAVIS, J., AUCOIN, D., SATO, T., AHUJA, S., AIMOTO, S., ELLIOTT, J. I., VAN NOSTRAND, W. E. & SMITH, S. O. 2010. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 561-7.
- AKAMA, K. T. & VAN ELDIK, L. J. 2000. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem*, 275, 7918-24.
- AKIRA, S. & HEMMI, H. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*, 85, 85-95.
- ALNEMRI, E. S. 2010. Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome. *J Clin Immunol*, 30, 512-9.
- BARDAN, A., NIZET, V. & GALLO, R. L. 2004. Antimicrobial peptides and the skin. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 543-9.
- BAUERNFEIND, F., ABLASSER, A., BARTOK, E., KIM, S., SCHMID-BURGK, J., CAVLAR, T. & HORNUNG, V. 2010. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci*, 68, 765-83.
- BLUM-DEGEN, D., MULLER, T., KUHN, W., GERLACH, M., PRZUNTEK, H. & RIEDERER, P. 1995. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, 202, 17-20.
- BRAUN-FALCO, M., KOVNERYSTYY, O., LOHSE, P. & RUZICKA, T. 2012. Pyoderma gangrenosum, acne, and suppurative hidradenitis (PASH)--a new autoinflammatory syndrome distinct from PAPA syndrome. *J Am Acad Dermatol*, 66, 409-15.
- BRAUN-FALCO, O. 2005. *Dermatologie und Venerologie*, Heidelberg, Springer.
- BROWN, J., WANG, H., HAJISHENGALLIS, G. N. & MARTIN, M. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res*, 90, 417-27.
- CANOUI-POITRINE, F., LE THUAUT, A., REVUZ, J. E., VIALLETTE, C., GABISON, G., POLI, F., POUGET, F., WOLKENSTEIN, P. & BASTUJI-GARIN, S. 2012. Identification of Three Hidradenitis Suppurativa Phenotypes: Latent Class Analysis of a Cross-Sectional Study. *J Invest Dermatol*.
- CAPIRALLA, H., VINGTDEUX, V., ZHAO, H., SANKOWSKI, R., AL-ABED, Y., DAVIES, P. & MARAMBAUD, P. 2012. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Abeta-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. *J Neurochem*, 120, 461-72.
- CAPPELLANO, G., CARECCHIO, M., FLEETWOOD, T., MAGISTRELLI, L., CANTELLO, R., DIANZANI, U. & COMI, C. 2013. Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis*, 2, 89-107.

- CONTASSOT, E., BEER, H. & FRENCH, L. 2012. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*, 142, 0.
- CREAGH, E. M. & O'NEILL, L. A. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*, 27, 352-7.
- DE HEREDIA, F. P., GOMEZ-MARTINEZ, S. & MARCOS, A. 2012. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc*, 71, 332-8.
- DE KONING, H. D., SIMON, A., ZEEUWEN, P. L. & SCHALKWIJK, J. 2012. Pattern recognition receptors in infectious skin diseases. *Microbes Infect*.
- DINARELLO, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27, 519-50.
- DINARELLO, C. A. 2010. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*, 40, 599-606.
- DINARELLO, C. A. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117, 3720-32.
- DOMBROWSKI, Y., PERIC, M., KOGLIN, S., KAMMERBAUER, C., GOSS, C., ANZ, D., SIMANSKI, M., GLASER, R., HARDER, J., HORNUNG, V., GALLO, R. L., RUZICKA, T., BESCH, R. & SCHAUER, J. 2011. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med*, 3, 82ra38.
- FELDMEYER, L., WERNER, S., FRENCH, L. E. & BEER, H. D. 2010. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur J Cell Biol*, 89, 638-44.
- FIMMEL, S. & ZOUBOULIS, C. C. 2010. Comorbidities of hidradenitis suppurativa (acne inversa). *Dermatoendocrinol*, 2, 9-16.
- GAO, M., WANG, P. G., CUI, Y., YANG, S., ZHANG, Y. H., LIN, D., ZHANG, K. Y., LIANG, Y. H., SUN, L. D., YAN, K. L., XIAO, F. L., HUANG, W. & ZHANG, X. J. 2006. Inversa acne (hidradenitis suppurativa): a case report and identification of the locus at chromosome 1p21.1-1q25.3. *J Invest Dermatol*, 126, 1302-6.
- GAY, N. J. & GANGLOFF, M. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*, 76, 141-65.
- GENER, G., CANOUI-POITRINE, F., REVUZ, J. E., FAYE, O., POLI, F., GABISON, G., POUGET, F., VIALLETTE, C., WOLKENSTEIN, P. & BASTUJI-GARIN, S. 2009. Combination therapy with clindamycin and rifampicin for hidradenitis suppurativa: a series of 116 consecutive patients. *Dermatology*, 219, 148-54.
- GRANT, A., GONZALEZ, T., MONTGOMERY, M. O., CARDENAS, V. & KERDEL, F. A. 2010. Infliximab therapy for patients with moderate to severe hidradenitis suppurativa: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *J Am Acad Dermatol*, 62, 205-17.
- HALLE, A., HORNUNG, V., PETZOLD, G. C., STEWART, C. R., MONKS, B. G., REINHECKEL, T., FITZGERALD, K. A., LATZ, E., MOORE, K. J. & GOLENBOCK, D. T. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 9, 857-65.
- HAO, W., LIU, Y., LIU, S., WALTER, S., GRIMM, M. O., KILIAAN, A. J., PENKE, B., HARTMANN, T., RUBE, C. E., MENGER, M. D. & FASSBENDER, K. 2011. Myeloid differentiation factor 88-deficient bone marrow cells improve Alzheimer's disease-related symptoms and pathology. *Brain*, 134, 278-92.
- HAPPLE, R. & KONIG, A. 2011. Smoker's boils. *Dermatology*, 222, 282-4.
- HASAN, U., CHAFFOIS, C., GAILLARD, C., SAULNIER, V., MERCK, E., TANCREDI, S., GUIET, C., BRIERE, F., VLACH, J., LEBECQUE, S., TRINCHIERI, G. & BATES, E. E. 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and

- plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*, 174, 2942-50.
- HASLUND, P., LEE, R. A. & JEMEC, G. B. 2009. Treatment of hidradenitis suppurativa with tumour necrosis factor-alpha inhibitors. *Acta Derm Venereol*, 89, 595-600.
- HENGGE, U., RUZICKA, T. 2006. *Lehrbuch der Dermatologie und Venerologie*, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- HOFFMANN, J., TWIESSELMANN, C., KUMMER, M. P., ROMAGNOLI, P. & HERZOG, V. 2000. A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur J Cell Biol*, 79, 905-14.
- HORNUNG, V., ABLASSER, A., CHARREL-DENNIS, M., BAUERNFEIND, F., HORVATH, G., CAFFREY, D. R., LATZ, E. & FITZGERALD, K. A. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458, 514-8.
- JANSEN, I., ALTMAYER, P. & PIEWIG, G. 2001. Acne inversa (alias hidradenitis suppurativa). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 15, 532-40.
- JEMEC, G. B. 2006. *Hidradenitis Suppurativa*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- JIN, C. & FLAVELL, R. A. 2013. Innate sensors of pathogen and stress: Linking inflammation to obesity. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 287-94.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13, 816-25.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84.
- KELLEHER, R. J., 3RD & SHEN, J. 2011. Genetics. Gamma-secretase and human disease. *Science*, 330, 1055-6.
- KELLER, M., RUEGG, A., WERNER, S. & BEER, H. D. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 132, 818-31.
- KOLLISCH, G., KALALI, B. N., VOELCKER, V., WALLICH, R., BEHRENDT, H., RING, J., BAUER, S., JAKOB, T., MEMPEL, M. & OLLERT, M. 2005. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 114, 531-41.
- KUMAR, H., KAWAI, T. & AKIRA, S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 621-5.
- LAMB, B. T., SISODIA, S. S., LAWLER, A. M., SLUNT, H. H., KITT, C. A., KEARNS, W. G., PEARSON, P. L., PRICE, D. L. & GEARHART, J. D. 1993. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet*, 5, 22-30.
- LEBRE, M. C., VAN DER AAR, A. M., VAN BAARSEN, L., VAN CAPEL, T. M., SCHUITEMAKER, J. H., KAPSENBERG, M. L. & DE JONG, E. C. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*, 127, 331-41.
- LEE, R. A., DOMMASCH, E., TREAT, J., SCIACCA-KIRBY, J., CHACHKIN, S., WILLIAMS, J., SHIN, D. B., LEYDEN, J. J., VITTORIO, C. & GELFAND, J. M. 2009. A prospective clinical trial of open-label etanercept for the treatment of hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*, 60, 565-73.
- LI, C. R., JIANG, M. J., SHEN, D. B., XU, H. X., WANG, H. S., YAO, X., ZHANG, Y., ZHOU, W. Q. & WANG, B. 2011. Two novel mutations of the nicastrin gene in Chinese patients with acne inversa. *Br J Dermatol*, 165, 415-8.
- LIM, J. E., KOU, J., SONG, M., PATTANAYAK, A., JIN, J., LALONDE, R. & FUKUCHI, K. 2011. MyD88 deficiency ameliorates beta-amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 179, 1095-103.

- LIM, K. H. & STAUDT, L. M. 2013. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a011247.
- LIU, S., LIU, Y., HAO, W., WOLF, L., KILIAAN, A. J., PENKE, B., RUBE, C. E., WALTER, J., HENEKA, M. T., HARTMANN, T., MENGER, M. D. & FASSBENDER, K. 2011a. TLR2 Is a Primary Receptor for Alzheimer's Amyloid beta Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation. *J Immunol*.
- LIU, Y., GAO, M., LV, Y. M., YANG, X., REN, Y. Q., JIANG, T., ZHANG, X., GUO, B. R., LI, M., ZHANG, Q., ZHANG, P., ZHOU, F. S., CHEN, G., YIN, X. Y., ZUO, X. B., SUN, L. D., ZHENG, X. D., ZHANG, S. M., LIU, J. J., ZHOU, Y., LI, Y. R., WANG, J., YANG, H. M., YANG, S., LI, R. Q. & ZHANG, X. J. 2011b. Confirmation by exome sequencing of the pathogenic role of NCSTN mutations in acne inversa (hidradenitis suppurativa). *J Invest Dermatol*, 131, 1570-2.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- MANDREKAR-COLUCCI, S. & LANDRETH, G. E. 2010. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 156-67.
- MARTINON, F., MAYOR, A. & TSCHOPP, J. 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27, 229-65.
- MASUHR, K. F. 2007. *Neurologie*, Stuttgart, Thieme.
- MEKKES, J. R. & BOS, J. D. 2008. Long-term efficacy of a single course of infliximab in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*, 158, 370-4.
- MENDONCA, C. O. & GRIFFITHS, C. E. 2006. Clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*, 154, 977-8.
- MILLER, I., LYNNGAARD, C. D., LOPHAVEN, S., ZACHARIAE, C., DUFOUR, D. N. & JEMEC, G. B. 2011. A double-blind placebo-controlled randomized trial of adalimumab in the treatment of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*, 165, 391-8.
- MOLL, I. 2010. *Duale Reihe Dermatologie*, Stuttgart, Thieme.
- NESTLE, F. O., DI MEGLIO, P., QIN, J. Z. & NICKOLOFF, B. J. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9, 679-91.
- NETEA, M. G., SIMON, A., VAN DE VEERDONK, F., KULLBERG, B. J., VAN DER MEER, J. W. & JOOSTEN, L. A. 2010. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog*, 6, e1000661.
- NEWTON, K. & DIXIT, V. M. 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- NIYONSABA, F., USHIO, H., NAKANO, N., NG, W., SAYAMA, K., HASHIMOTO, K., NAGAOKA, I., OKUMURA, K. & OGAWA, H. 2007. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol*, 127, 594-604.
- PEARSON, H. A. & PEERS, C. 2006. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol*, 575, 5-10.
- PERRY, A. K., CHEN, G., ZHENG, D., TANG, H. & CHENG, G. 2005. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res*, 15, 407-22.
- PINK, A. E., SIMPSON, M. A., BRICE, G. W., SMITH, C. H., DESAI, N., MORTIMER, P. S., BARKER, J. N. & TREMBATH, R. C. 2011. PSENEN and NCSTN mutations in familial hidradenitis suppurativa (Acne Inversa). *J Invest Dermatol*, 131, 1568-70.
- PINK, A. E., SIMPSON, M. A., DESAI, N., TREMBATH, R. C. & BARKER, J. N. 2013. gamma-Secretase mutations in hidradenitis suppurativa: new insights into disease pathogenesis. *J Invest Dermatol*, 133, 601-7.

- PLEWIG, G., LANDTHALER, M., BURGDORF, W., HERTL, M. & RUZICKA, T. 2012. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- RAMBHATLA, P. V., LIM, H. W. & HAMZAVI, I. 2012. A systematic review of treatments for hidradenitis suppurativa. *Arch Dermatol*, 148, 439-46.
- RASSNER, G. 2007. *Dermatologie*, München, Elsevier, Urban & Fischer.
- RASSOW, J. 2008. *Biochemie*, Stuttgart, Thieme.
- RYAN, D. A., NARROW, W. C., FEDEROFF, H. J. & BOWERS, W. J. 2010. An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity studies. *J Neurosci Methods*, 190, 171-9.
- SABAT, R., CHANWANGPONG, A., SCHNEIDER-BURRUS, S., METTERNICH, D., KOKOLAKIS, G., KUREK, A., PHILIPP, S., URIBE, D., WOLK, K. & STERRY, W. 2012. Increased prevalence of metabolic syndrome in patients with acne inversa. *PLoS One*, 7, e31810.
- SCHAUBER, J. & GALLO, R. L. 2007. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 127, 510-2.
- SCHAUBER, J. & GALLO, R. L. 2008. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 261-6.
- SCHMITZ, A., TIKKANEN, R., KIRFEL, G. & HERZOG, V. 2002. The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem Cell Biol*, 117, 171-80.
- SCHONBECK, U., MACH, F. & LIBBY, P. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 161, 3340-6.
- SCHRODER, K. & TSCHOPP, J. 2010. The inflammasomes. *Cell*, 140, 821-32.
- SIEDNIENKO, J., HALLE, A., NAGPAL, K., GOLENBOCK, D. T. & MIGGIN, S. M. 2010. TLR3-mediated IFN-beta gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur J Immunol*, 40, 3150-60.
- SIMARD, A. R., SOULET, D., GOWING, G., JULIEN, J. P. & RIVEST, S. 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49, 489-502.
- SIMMONS, L. K., MAY, P. C., TOMASELLI, K. J., RYDEL, R. E., FUSON, K. S., BRIGHAM, E. F., WRIGHT, S., LIEBERBURG, I., BECKER, G. W., BREMS, D. N. & ET AL. 1994. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol*, 45, 373-9.
- STROWIG, T., HENAO-MEJIA, J., ELINAV, E. & FLAVELL, R. 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481, 278-86.
- STUTZ, A., GOLENBOCK, D. T. & LATZ, E. 2009. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest*, 119, 3502-11.
- SUTER, M. M., SCHULZE, K., BERGMAN, W., WELLE, M., ROOSJE, P. & MULLER, E. J. 2009. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol*, 20, 515-32.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.
- UDAN, M. L., AJIT, D., CROUSE, N. R. & NICHOLS, M. R. 2008. Toll-like receptors 2 and 4 mediate A β (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem*, 104, 524-33.
- VAN DER ZEE, H. H., DE RUITER, L., VAN DEN BROECKE, D. G., DIK, W. A., LAMAN, J. D. & PRENS, E. P. 2011. Elevated levels of tumour necrosis factor

- (TNF)-alpha, interleukin (IL)-1beta and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF-alpha and IL-1beta. *Br J Dermatol*, 164, 1292-8.
- VAN DER ZEE, H. H., VAN DER WOUDE, C. J., FLORENCIA, E. F. & PRENS, E. P. 2010. Hidradenitis suppurativa and inflammatory bowel disease: are they associated? Results of a pilot study. *Br J Dermatol*, 162, 195-7.
- VARDY, E. R., CATTO, A. J. & HOOPER, N. M. 2005. Proteolytic mechanisms in amyloid-beta metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, 11, 464-72.
- VAZQUEZ, B. G., ALIKHAN, A., WEAVER, A. L., WETTER, D. A. & DAVIS, M. D. 2013. Incidence of hidradenitis suppurativa and associated factors: a population-based study of Olmsted County, Minnesota. *J Invest Dermatol*, 133, 97-103.
- WALTER, S., LETIEMBRE, M., LIU, Y., HEINE, H., PENKE, B., HAO, W., BODE, B., MANIETTA, N., WALTER, J., SCHULZ-SCHUFFER, W. & FASSBENDER, K. 2007. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, 20, 947-56.
- WANG, B., YANG, W., WEN, W., SUN, J., SU, B., LIU, B., MA, D., LV, D., WEN, Y., QU, T., CHEN, M., SUN, M., SHEN, Y. & ZHANG, X. 2010. Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa. *Science*, 330, 1065.
- WARNER, N. & NUNEZ, G. 2013. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol*, 190, 3-4.
- WOLK, K., WARSZAWSKA, K., HOEFLICH, C., WITTE, E., SCHNEIDER-BURRUS, S., WITTE, K., KUNZ, S., BUSS, A., ROEWERT, H. J., KRAUSE, M., LUKOWSKY, A., VOLK, H. D., STERRY, W. & SABAT, R. 2011. Deficiency of IL-22 contributes to a chronic inflammatory disease: pathogenetic mechanisms in acne inversa. *J Immunol*, 186, 1228-39.
- WOLLINA, U., KOCH, A., HEINIG, B., KITTNER, T. & NOWAK, A. 2013. Acne inversa (Hidradenitis suppurativa): A review with a focus on pathogenesis and treatment. *Indian Dermatol Online J*, 4, 2-11.
- ZHANG, H., MA, Q., ZHANG, Y. W. & XU, H. 2012. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem*, 120 Suppl 1, 9-21.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Jürgen Schauber für die Überlassung des Themas, seine zahlreichen Ideen und Anregungen sowie die Unterstützung durch sein fundiertes Fachwissen danken. Seine Leidenschaft für die Forschung und seine Begeisterung bei positiven Forschungsergebnissen haben mich stets ermutigt und einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet.

Großer Dank gilt auch meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Yvonne Dombrowski. Ihr danke ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung, ihre ständige Unterstützung bei den Versuchen sowie ihre Geduld, ihr Engagement und ihre Ideen, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Für die exzellente Betreuung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bedanken.

Sarah Koglin, Dr. med. Markus Reinholz und den anderen Forschungsteams möchte ich ebenfalls für die herzliche und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die Unterstützung danken. Vor allem Sarah war mir eine große Hilfe bei der Durchführung der Versuche und stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka danke ich für die Möglichkeit, die Forschungsarbeit in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie durchzuführen.

Meinen Freunden danke ich für ihre großartige Unterstützung und ihren Beistand außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Stefan, der mich während der Zeit im Labor und während des gesamten Studiums begleitet, unterstützt und ermutigt hat. Mit ihm konnte ich meine Erfolgserlebnisse, aber auch meine Sorgen teilen.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner großartigen Familie bedanken. Durch ihre Unterstützung während des gesamten Studiums wurde ich ununterbrochen ermutigt, auch in schweren Zeiten nicht aufzugeben. Ohne sie wäre all das nicht möglich gewesen.

10 Eidesstattliche Versicherung

Blatner, Carolin

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Aktivierung angeborener Immunmechanismen in der Haut durch Amyloid β

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift