

Aus der Klinik für Dermatologie,  
Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Etablierung der funktionellen Charakterisierung von primären  
Keratinocyten aus adulter Epidermis zur Untersuchung der  
Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  in der Pathogenese der  
Psoriasis vulgaris**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Friederike Gerken  
aus Berlin

Dekanin: Fr. Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Sterry  
2. Prof. Dr. med. J. C. Prinz  
3. Prof. Dr. med. W.-H. Boehncke

Datum der Promotion: 18.11.2011

*Meiner Mutter Doris Gerken  
(1956-2007)  
Terminus vitae non amoris*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Krankheitsbild Psoriasis.....	1
1.2. Aktuelles Konzept der Pathogenese der Psoriasis.....	2
1.2.1. <i>Psoriasis und kardiovaskuläre Komorbidität.....</i>	<i>4</i>
1.3. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs).....	6
1.3.1. <i>PPARs in der epidermalen Biologie .....</i>	<i>8</i>
1.3.2. <i>PPAR<math>\delta</math> und Psoriasis.....</i>	<i>11</i>
1.4. Methoden der Kultivierung und funktionellen Charakterisierung der Genexpression in primären Keratinozyten und Fibroblasten.....	12
1.4.1. <i>Kulturverfahren nach Rheinwald und Green.....</i>	<i>13</i>
1.4.2. <i>Methoden der Charakterisierung der Genexpression primärer Zellen.....</i>	<i>13</i>
1.4.3. <i>Manipulative Verfahren .....</i>	<i>16</i>
1.5. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe .....	20
1.5.1. <i>Genexpressionsstudien mittels Affymetrix HG_U95A .....</i>	<i>20</i>
1.5.2. <i>Etablierung lentiviraler Vektoren.....</i>	<i>21</i>
1.6. Zielstellung dieser Promotionsarbeit .....	22
<b>2. Material.....</b>	<b>23</b>
2.1. Materialien und Geräte.....	23
2.2. Kits .....	23
2.3. Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.4. Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	25
2.4.1. <i>Zusammensetzung verwendeter Nährmedien.....</i>	<i>25</i>
2.5. Oligonukleotide.....	26
2.5.1. <i>Primer für die RT- PCR .....</i>	<i>26</i>
2.5.2. <i>shRNA-Nukleotide.....</i>	<i>26</i>
2.6. Vektoren.....	26
2.7. Bakterienstämme .....	27
2.8. Humane Zelllinien.....	27
2.9. Puffer und Lösungen .....	27
<b>3. Methoden .....</b>	<b>29</b>

3.1.	Zellkultur.....	29
3.1.1.	<i>Primäre humane Keratinozytenkultur</i> .....	29
3.1.2.	<i>Primäre humane Fibroblastenkultur</i> .....	32
3.2.	Stimulationsversuche mit primären humanen Fibroblasten und Keratinozyten .....	33
3.2.1.	<i>Stimulation primärer humaner Fibroblasten</i> .....	33
3.2.2.	<i>Stimulation primärer humaner Keratinozyten</i> .....	34
3.3.	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) Studien.....	34
3.3.1.	<i>Aufarbeitung des Zellmaterials für die PCR</i> .....	34
3.3.2.	<i>PCR-Reagenzien</i> .....	37
3.3.3.	<i>Ablauf der PCR</i> .....	37
3.3.4.	<i>Auswahl spezifischer Primer und Berechnung der Annealingtemperatur</i> ...	39
3.3.5.	<i>PCR mit spezifischen Primern</i> .....	39
3.3.6.	<i>Auswertung mittels Agarosegel-Elektrophorese</i> .....	40
3.4.	Klonierung eines si-RNA-tragenden lentiviralen Transfervektors (pLL 3.7 mit shRNA).....	41
3.4.1.	<i>Austestung der shRNA-Sensesequenz durch das Lipofectamin-Protokoll</i> . 41	
3.4.2.	<i>Annealing des Sense- und Antisensestranges zum Doppelstrangoligo</i> .....	43
3.4.3.	<i>Verdau des Vektorplasmids</i> .....	43
3.4.4.	<i>Ligation von Vektorplasmid und shRNA-Insert</i> .....	44
3.4.5.	<i>Aufreinigung des Plasmids mittels Gelextraktion</i> .....	44
3.4.6.	<i>Transformation in kompetente Stbl2-Zellen</i> .....	45
3.4.7.	<i>Wachstum der kompetenten Zellen auf Agarplatten</i> .....	45
3.4.8.	<i>Plasmidamplifikation und –isolierung</i> .....	46
3.4.9.	<i>Plasmidsequenzierung</i> .....	47
3.5.	Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren zur stabilen Transfektion primärer humaner Keratinozyten .....	47
3.5.1.	<i>Virusproduktion</i> .....	47
3.5.2.	<i>Bestimmung des Virustiters</i> .....	49
3.6.	Transfektion primärer humaner Keratinozyten (Protokolloptimierung) .....	49
3.7.	Microarrayversuche.....	50
3.7.1.	<i>Stimulation primärer humaner Keratinozyten mit L-165041</i> .....	50
3.7.2.	<i>Isolation von RNA primärer humaner Keratinozyten für den Microarray</i> ....	51
3.7.3.	<i>Auswertung des Microarrays zur Detektion von PPAR<math>\delta</math>-Zielgenen</i> .....	52

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
4.1.	Erfolgreiche Etablierung der Keratinozytenkultur .....	53
4.2.	RT-PCR-Studien .....	55
4.2.1.	<i>Ergebnisse der PCR-Studien an primären Fibroblasten aus läSIONaler vs. nicht läSIONaler Haut von Psoriasispatienten</i> .....	55
4.2.2.	<i>Stimulationsversuche an primären nicht läSIONalen Fibroblasten aus psoriatischer Haut</i> .....	57
4.3.	Lentivirale Transfektion .....	58
4.3.1.	<i>Etablierung des Zentrifugationsverfahrens</i> .....	58
4.3.2.	<i>Nachweis der erfolgreichen down-Regulation von <math>\beta</math>-Catenin durch shRNA61</i> .....	
4.4.	Micro-Array-Studien (PIQUOR SkinPatho microarray) .....	62
4.4.1.	<i>Ergebnisse interner Vorarbeiten und der Literaturrecherche</i> .....	62
4.4.2.	<i>PIQUOR SkinPatho Microarray</i> .....	63
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
5.1.	Feeder-Layer-Co-Kultur mit humanen Fibroblasten als Feeder-Layer .....	69
5.2.	Lentivirale Transfektion humaner Keratinozyten aus psoriatischer Haut....	70
5.3.	PPAR $\delta$ - ein zentrales und integratives Regulatorgen der Psoriasispathogenese .....	72
5.4.	PPAR $\delta$ -Blockade als mögliche antipsoriatische Therapieoption .....	74
5.5.	Bedeutung der regulatorischen Verbindung zwischen PPAR $\delta$ und HB-EGF in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris .....	76
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>84</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Aktivierung von PPAR $\delta$ durch spezifische Liganden.....	7
Abbildung 2: Die Rolle von PPAR $\delta$ während der Wundheilung.....	10
Abbildung 3: Wirkungsprofil von PPAR $\delta$ über die Aktivierung von Zielgenen in psoriatischer Haut.....	12
Abbildung 4: Humane Keratinozyten aus läsionaler psoriatischer Haut .....	54
Abbildung 5: Expression von PPAR $\delta$ in läsionalen und nicht-läsionalen Fibroblasten .....	56
Abbildung 6: Expression von WNT5a in läsionalen und nicht-läsionalen Fibroblasten .....	56
Abbildung 7: Stimulation primärer nicht läsionaler Fibroblasten mit LiCl und TNF $\alpha$ .	58
Abbildung 8: FACS-Analyse der Transfektionsversuche .....	61
Abbildung 9: Herunterregulation von $\beta$ -Catenin in primären psoriatischen Keratinozyten durch lentivirale Transfektion .....	62
Abbildung 10: Hybridisierungsschema des PIQUOR SkinPatho Microarrays. Vergleich A (links) und Vergleich B (rechts). .....	66

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	25
Tabelle 2: Stimulation primärer humaner Fibroblasten .....	33
Tabelle 3: Stimulation primärer humaner Keratinozyten .....	34
Tabelle 4: Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese aus RNA I.....	35
Tabelle 5: Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese aus RNA II (1x Ansatz).....	37
Tabelle 6: Ablauf der PCR .....	38
Tabelle 7: PCR-Protokolle mit spezifischen Primern .....	40
Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes.....	40
Tabelle 9: Ablauf der Testung von shRNA-Sensessequenzen mittels Lipofectamin ..	42
Tabelle 10: Reaktionsansatz des Vektorverbaus mit Restriktionsenzymen.....	44
Tabelle 11: Reaktionsansatz der Ligation von Vektorplasmid und shRNA-Insert .....	44
Tabelle 12: Ansatz zur Herstellung ampicillinhaltiger Agarplatten .....	45
Tabelle 13: Protokoll zur Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren mittels 293-FT-Zellen.....	48
Tabelle 14: Transfektion von HeLa-Zellen zur Bestimmung des Virustiters.....	49
Tabelle 15: Ablauf der Transfektion primärer humaner Keratinozyten. Standardprotokoll vs. Zentrifugationsprotokoll.....	50
Tabelle 16: Ablauf der Stimulation von primären humanen Keratinozyten mittels L-165041.....	51
Tabelle 17: Auswertung der Transfektionsraten primärer humaner Keratinozyten mittels FACS.....	60
Tabelle 18: Probenanordnung zur Auswertung des PIQUOR SkinPatho Microarray	64
Tabelle 19: Durch PPAR $\delta$ -Aktivierung induzierte Gene in primären humanen Keratinozyten.....	67

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Krankheitsbild Psoriasis

Die Psoriasis vulgaris ist eine häufige chronisch-entzündliche Hauterkrankung, die einem polygenetischen Erbgang folgt und durch autoimmunologisch medierte Entzündungsprozesse sowie durch epidermale Hyperproliferation bedingt ist. Die Psoriasis ist weltweit verbreitet, wobei die höchsten Prävalenzraten von 2-3% der Gesamtbevölkerung innerhalb von kaukasischen Populationen in Nord- und Mitteleuropa sowie den USA angetroffen werden. Die Erkrankung manifestiert sich bevorzugt innerhalb der 2. und 3. Lebensdekade. Zwei Drittel der Psoriatiker erkranken vor dem 25. Lebensjahr (Early onset oder Typ-1 Psoriasis), ein Auftreten der Psoriasis vor der Pubertät ist jedoch die Ausnahme.<sup>1</sup>

Psoriasis ist mit bestimmten HLA-Typen assoziiert und mehrere Suszeptibilitätsloci konnten bereits identifiziert werden.<sup>2</sup> Die Konkordanz homozygoter Zwillinge liegt bei 70%. Nach der Erstmanifestation, die häufig als exanthematischer Schub nach einem externen Trigger (bspw. Streptokokkeninfekte) auftritt, verläuft die Psoriasis vulgaris in den meisten Fällen chronisch rezidivierend und bleibt lebenslang – meist in Form von chronischen Plaques wechselnder Intensität an den Prädilektionsstellen – bestehen. Diese umfassen die Streckseiten der Extremitäten, die Sakralregion und den behaarten Kopf, wobei eine symmetrische Verteilung der Läsionen typisch ist. Sonderformen wie die Psoriasis palmo-plantaris oder die seltene Psoriasis inversa weichen von diesem Verteilungsmuster ab. Die Bereitschaft einer erkrankten Person, psoriatische Plaques auszubilden, wird offenbar durch dispositionelle, erworbene und umweltbedingte Faktoren mitbestimmt. Besteht ein hoher Krankheitsdruck, kann das Auftreten der Läsionen durch exogene Reize wie Kratzen, UV-Strahlung oder irritative Lokaltherapie provoziert werden (sogenannter Köbner-Effekt). Anhand der saisonalen Schwankungen der Krankheitsaktivität mit Besserung in den Sommermonaten, der Verschlechterung der Psoriasis im Rahmen der HIV-Infektion und der Auslösbarkeit durch Medikamente wie Betarezeptorenblocker, Lithium und Interferon  $\alpha$  und  $\gamma$  lässt sich das Zusammenspiel endogener und exogener Faktoren bei der Psoriasis beobachten.

Klinisch präsentiert sich die psoriatische Läsion als ein kreisrunder, scharf begrenzter, nicht pruriginöser, erythematöser Herd mit variabler Infiltration in die Dermis und charakteristischer silbrig-weißer groblamellöser Schuppung. Die

Schuppen lassen sich mittels eines Spatels einfach und in Gänze abheben (Kerzentropfphänomen), wobei es nach Entfernung einiger Schuppenlagen zu punktförmigen Blutungen aus den hypervaskularisierten dermalen Papillenspitzen kommt (Auspitz-Phänomen).

Die Herde haben bei der Entstehung im akuten Schub nur Punktgröße (Psoriasis punctata) und vergrößern sich schnell durch peripheres Wachstum (Psoriasis guttata). Dabei entstehen teilweise großflächige, bizarr konfigurierte psoriatische Läsionen (Psoriasis geographica). Die Maximalvariante der Erkrankung ist die psoriatische Erythrodermie mit Befall des gesamten Integuments. Die Rückbildung psoriatischer Herde beginnt im Zentrum, so dass sich häufig ringförmige Strukturen ausbilden. Nach Abheilung geht die Läsion in einen hypopigmentierten Fleck, das psoriatische Leukoderm, über. Dieses repigmentiert innerhalb weniger Wochen.

Histologisch ist die chronische Plaque-Psoriasis durch eine massive Akanthose, basale und suprabasale Mitoseaktivität, Kernretention im oberen Stratum spinosum sowie das Fehlen des Stratum granulosum gekennzeichnet. Die Rete-Leisten sind verlängert und reichen weit in die Dermis hinein. Es zeigt sich eine Neovaskularisation im Bereich der Papillenspitzen und eine massive Infiltration der Epidermis und retikulären Dermis mit T-Zellen und Neutrophilen. Letztere bilden fokale subkorneale Verdichtungen (Munro-Mikroabszesse) aus.<sup>3</sup>

## **1.2. Aktuelles Konzept der Pathogenese der Psoriasis**

Psoriasis ist eine extrem komplexe Erkrankung und gilt heute als die häufigste durch eine gestörte zelluläre Immunität vermittelte Autoimmunkrankheit des Menschen, wobei ein primärer Auslöser der Psoriasispathogenese noch nicht detektiert werden konnte.<sup>4</sup> Es gilt mittlerweile als gesichert, dass zu einem frühen Zeitpunkt in der Psoriasispathogenese T-Zellen in die Epidermis einwandern und sich dort massiv vermehren. Ein epidermales Autoantigen als Auslöser einer T-zellvermittelten Immunantwort konnte trotz intensiver Bemühungen noch nicht identifiziert werden. Die eingewanderten T-Lymphozyten werden in der Haut von CD11c-positiven dendritischen Zellen (DC-Zellen), welche dazu IL-23, TNF $\alpha$  und INF $\alpha$  exprimieren, aktiviert und zur Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene angeregt. Eine besondere Bedeutung kommt der sog. Th-17-Zellpopulation zu. Diese speziellen T-Helferzellen werden beispielsweise über die Zytokine IL-12 und IL-22 zur Expansion

angeregt. Über die Produktion von IL-17 werden wiederum Keratinozyten zur Produktion proinflammatorischer Zytokine angeregt. Diese umfassen unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , VEGF. Nachfolgend entsteht die charakteristische epidermale Hyperproliferation.<sup>4</sup> Die besondere Bedeutung der T-Lymphozyten als krankheitsauslösende Zellpopulation konnte mittels Untersuchungen an immundefizienten SCID-Mäusen bestätigt werden. Wird unbefallene Haut von Psoriatikern auf den Rücken einer SCID-Maus transplantiert, so entwickelt sich nach Injektion von T-Lymphozyten des gleichen Spenders ein psoriatischer Phänotyp.<sup>5</sup> Psoriatische Keratinozyten exprimieren ihrerseits wiederum Zytokine mit leukotaktischer Wirkung wie IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF $\alpha$ , PDGF und ECGF. Diese bewirken die weitere Einwanderung von Immunzellen in die psoriatische Haut und die psoriatische Neovaskularisation. Durch eine vermehrte Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten und Gefäßendothelzellen ist den Lymphozyten die Diapedese in die Epidermis erleichtert. In der Zusammenschau ergibt sich ein komplexes Netzwerk mit wechselseitiger parakriner Stimulation und Selbsterhaltung des Entzündungsprozesses durch die beteiligten Zelltypen.

Psoriatische Keratinozyten weisen Besonderheiten im Sinne einer massiv beschleunigten Transitzeit und einer unvollständigen Differenzierung, die sich in der Expression von Keratin 6 und Keratin 16 bis in das Stratum spinosum hinein zeigen, auf. Neuere Studien weisen auf Parallelen zwischen der gesteigerten Keratinozytenproliferation während der regenerativen Phase der Wundheilung und der Situation in psoriatischer Haut hin, wobei der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor PPAR $\delta$  als ein wichtiger Regulator benannt ist.<sup>6, 7</sup> Zusätzlich kommt es zu einer unvollständigen Ausbildung des Cornified Envelopes mit der Folge einer verstärkten Austrocknung und groblammellösen Abschuppung der unreifen Keratinozyten von der psoriatischen Epidermis.

Obgleich die komplexen immunologischen und Genexpressionsstörungen der Psoriasis gut beschrieben sind, konnten bis heute nur ungenügende Erkenntnisse über deren Verbindungen zu den bekannten genetischen Veränderungen bei Psoriatikern gewonnen werden. Bisher konnten circa 20 Psoriasis-suszeptibilitätsloki im humanen Genom identifiziert werden. Der bekannteste Suszeptibilitätsloкус PSORS1 liegt in der HLA-Region von Chromosom 6 (C6p21) und beinhaltet das Psoriasisrisikoallel HLA-Cw6. Die Erstbeschreibung liegt annähernd 30 Jahre zurück und bezog sich auf Untersuchungen an einer finnischen Population.<sup>8</sup> Die exakte

Lokalisation von PSORS1 konnte jedoch aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts in dieser Region noch nicht bestimmt werden.<sup>9</sup>

Die Technik der chipgebundenen Microarray-Analysen eröffnet neue Möglichkeiten der genomweiten Suche nach Psoriasis-suszeptibilitätsloci. So konnten beispielsweise die Gene IL23B und IL23R aus der IL23-gebundenen Signalkaskade als gesicherte Psoriasis-suszeptibilitätsgene detektiert werden.<sup>10</sup> Ferner wurden sowohl in einer nordamerikanischen und europäischen, als auch in einer chinesischen Population Gene des LCE-Clusters als Psoriasis-suszeptibilitätsgene beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Gene LCE3C und LCE3B in psoriatischen Hautproben signifikant häufiger nachweisbar ist.<sup>11</sup> Der LCE-Cluster enthält Gene, die für Proteine des late cornified envelopes stehen und maßgeblich an der terminalen Differenzierung reifer Keratinozyten beteiligt sind. Eine psoriasis-assoziierte Deletion in diesem Bereich des Genoms könnte die krankheitsspezifische mangelhafte Ausdifferenzierung von Keratinozyten im oberen Stratum corneum erklären.

Zukünftige Forschungsbemühungen werden sich auf die Integration der bekannten genetischen, zellulären und immunologischen Aspekte der Psoriasispathogenese zu einem tragfähigen kombinierten Erklärungsmodell konzentrieren. Ferner kommt der Frage, ob die psoriatischen Keratinozyten selbst einen Suszeptibilitätsfaktor beisteuern, große Bedeutung zu. Die vorliegende Arbeit befasst sich unter anderem mit der Etablierung von Methoden zur funktionellen Charakterisierung psoriatischer Keratinozyten.

### **1.2.1. Psoriasis und kardiovaskuläre Komorbidität**

Psoriasis ist assoziiert mit einer erhöhten Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen eine unter Psoriatikern deutlich erhöhte kardiovaskuläre Komorbidität mit signifikant erhöhter Häufigkeit von Artherosklerose, Adipositas und metabolischem Syndrom.<sup>12,13,14</sup> Insbesondere ein erhöhter BMI korreliert mit der Schwere psoriatischer Hautveränderungen.<sup>15</sup> Ein erhöhter BMI konnte zudem als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Psoriasis identifiziert werden.<sup>16</sup>

Microarray-Analysen konnten zeigen, dass die Transkription von Genen mit funktioneller Bedeutung für den Fettsäuremetabolismus in läsionaler psoriatischer

Haut erheblich dysreguliert ist, wobei eine deutliche Überexpression dieser fettstoffwechselassoziierten Gene vorliegt. Funktionelle Bedeutung kommt dabei beispielsweise den Genen FABP5 und CRABP 2 zu. Diese fungieren als Aktivatoren des in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$ .<sup>17</sup> Gleichfalls konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter BMI zu einer gesteigerten Aktivität der TNF $\alpha$ -assoziierten Entzündungskaskade führt.<sup>18</sup> Besondere Bedeutung kommt dabei der gesteigerten Produktion von MCP-1 durch Adipozyten zu. MCP-1 bewirkt eine verstärkte Immigration von Makrophagen in adipöses Gewebe und führt gleichzeitig zu deren Aktivierung. Dies führt wiederum zu einer Produktion von TNF $\alpha$  durch die Makrophagen. TNF $\alpha$  verstärkt nachfolgend erneut die Produktion von MCP-1, sodass ein selbstverstärkender, parakriner Stimulationseffekt zwischen Makrophagen und Adipozyten mit der Folge der Ausbildung eines inflammatorischen Mikromilieus entsteht.<sup>19</sup> Dabei besteht die Idee, dass ein durch die gesteigerte Fettstoffwechselaktivität bei Patienten mit metabolischem Syndrom chronisch vorhandenes inflammatorisches Mikromilieu ausgebildet wird, auf dessen Boden immunmedierte Erkrankungen, wie beispielsweise die Psoriasis, bevorzugt zur Ausbildung gelangen.

Die Induzierbarkeit von PPAR $\delta$  durch TNF $\alpha$  ist bekannt. Eine pathophysiologisch relevante Kausalkette zwischen Adipositas, konsekutiv gesteigertem intrazellulärem Fettsäuremetabolismus und nachfolgender TNF $\alpha$ -Aktivierung mit letztendlicher PPAR $\delta$ -Überexpression kann geschlussfolgert werden. Dabei kommt PPAR $\delta$  eine entscheidende Rolle als Verbindungsglied zwischen gesteigerter, durch TNF $\alpha$  induzierter Inflammation und der Ausbildung eines psoriatischen Phänotyps zu. Dieses Modell ist jedoch nicht nur auf die Psoriasis als kutanes Beispiel einer gesteigerten Inflammation anzuwenden. Auch auf die Arteriosklerose als gefäßwandgebundene Entzündung lässt sich dieses Modell anwenden.

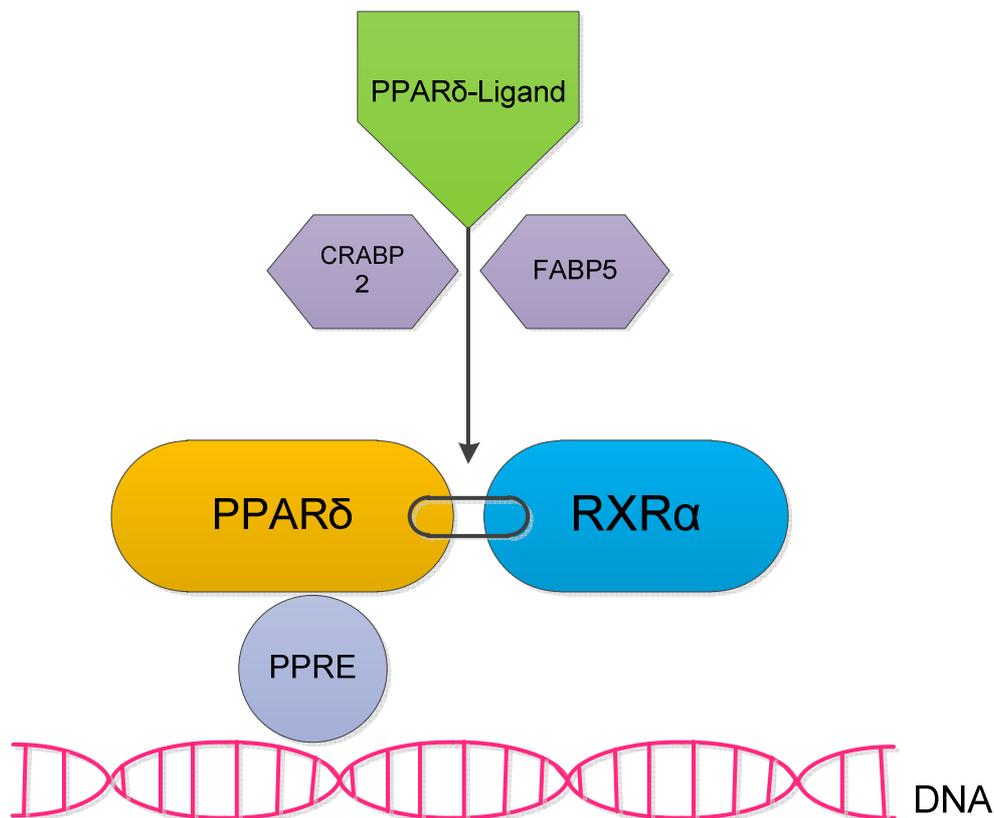
Sowohl die Psoriasis als auch die erwähnten kardiovaskulären Begleiterkrankungen weisen als zentrale pathophysiologische Komponente ein vornehmlich TNF $\alpha$ -induziertes inflammatorisches Mikromilieu auf. Dass der ebenfalls TNF $\alpha$ -vermittelten Überexpression von PPAR $\delta$  eine pathophysiologische Rolle zukommt, wird durch die klinische Beobachtung der signifikanten Verbesserung psoriatischer Läsionen unter der Therapie mit funktionellen PPAR $\delta$ -Antagonisten, wie sie in Form der Thiazolidine zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 und des metabolischen Syndroms Einsatz finden, indirekt unterstützt. Thiazolidine wirken

dabei über eine Reduktion der TNF $\alpha$ -Produktion in Adipozyten. Klinisch besteht die Beobachtung, dass die Thiazolidine sowohl zu einer Gewichtsreduktion als auch zu einer Verbesserung der Psoriasis und anderer chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen führen.<sup>20</sup> Als Grund für diesen zweifach positiven Effekt kann eine Unterdrückung der adipozytengebundenen TNF $\alpha$ -Produktion angesehen werden.<sup>21</sup> Von gesteigerten Interesse ist auch die Feststellung, dass bestimmte Nahrungsbestandteile, wie beispielsweise das Kapsaizin, zu einer PPAR $\gamma$ -vermittelten Minderung der adipositas-assoziierten Inflammation führen können.<sup>19</sup>

### **1.3. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)**

Peroxisome proliferator activated receptors sind durch spezifische Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren. Sie haben eine regulatorische Funktion auf die Expression von zahlreichen Zielgenen mit Bedeutung für verschiedene zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Entzündungskaskade. Erstmals kloniert wurden die PPARs, die zur Familie der nuclear hormone receptors (NHRs) gezählt werden, im Jahr 1990. Aufgrund ihrer proliferationsfördernden Wirkung auf Peroxisomen in murinen Leberzellen wurden diese entsprechend benannt.<sup>22</sup> Die PPAR-Familie besteht aus drei Mitgliedern, den Transkriptionsfaktoren PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und PPAR $\delta$ . PPAR $\delta$  wird, in der Literatur uneinheitlich, auch PPAR $\beta$  genannt. Die PPAR werden von unterschiedlichen Genen kodiert und besitzen sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte.<sup>23,24</sup>

Um als Transkriptionsfaktoren wirkungsvoll an die genomische DNA zu binden, benötigen alle PPAR Isoformen die Heterodimerisation mit dem als Koaktivator fungierenden Retinoid X Rezeptor alpha (RXR $\alpha$ ).<sup>6</sup> Diese Bindung wird durch ligandeninduzierte Konformationsänderung erleichtert. PPARs aktivieren die Expression von Zielgenen mit spezifischen PPAR-Responsive Elements (PPRE) im Promotorbereich. Abbildung 1 zeigt exemplarisch die Aktivierung von PPAR $\delta$  durch spezifische Liganden.



**Abbildung 1: Die Aktivierung von PPARδ durch spezifische Liganden**

Um aktiviert zu werden, benötigen alle drei PPAR-Isoformen die Bindung spezifischer Liganden, wie beispielsweise freie Fettsäuren oder Retinoinsäure. Die Liganden werden durch spezifische Bindungsproteine an den PPAR herangeführt. Die Transportproteine FABP 5 (fatty acid binding protein 5) und CRABP 2 (cellular retinoic acid binding protein 2) dienen dabei spezifisch dem Transport von Liganden an PPARδ. Die Bindung spezifischer Liganden führt zu einer Konformationsänderung von PPARδ. Diese Konformationsänderung erleichtert nachfolgend die obligate Heterodimerisation mit dem Retinoinsäurerezeptor RXRα (retinoic acid X-Receptor α). Nach erfolgter Heterodimerisation bindet der Komplex aus PPARδ und dem RXRα an Zielgene mit PPRE im Promotorbereich und reguliert deren Transkription.

PPARα wird vorwiegend in Geweben mit gesteigertem Fettsäurestoffwechsel wie beispielsweise der Leber, dem Myokard und dem braunen Fettgewebe exprimiert. Als Liganden dienen unter anderem die Metabolite der Lipoxygenase. PPARα verfügt über Funktionen bei der Regulation von Schlüsselenzymen des Fettsäure- und Lipoproteinkatabolismus.<sup>25</sup> Die Isoform PPARγ hingegen ist ein bedeutender Regulator der Adipozytendifferenzierung und Lipidspeicherung. Klinische Bedeutung wird PPARγ durch seine Wirkung als Angriffspunkt der Glitazon-Antidiabetika Rosiglitazon und Pioglitazon beigemessen.<sup>26</sup> Außerdem wurden PPARγ antineoplastische Eigenschaften zugeschrieben, beispielsweise beim Kolonkarzinom,

beim Blasenkarzinom und auch beim malignen Melanom. Dabei wurden den Thiazolidinen sogar zahlreiche, indirekt und direkt durch PPAR $\gamma$ -vermittelte antineoplastische Wirkungen zugeschrieben, so dass insbesondere die synthetische Substanz Iglitazon bereits als möglicher antineoplastisch wirksames Chemotherapeutikum diskutiert wird.<sup>27-30</sup> Als potenter antiinflammatorisch wirksamer Transkriptionsfaktor wirkt PPAR $\gamma$  in vielerlei Hinsicht als Gegenspieler der in dieser Arbeit untersuchten Isoform PPAR $\delta$ . Dabei kommt besonders der Hemmung des proproliferativ wirksamen Transkriptionsfaktors STAT 3 durch PPAR $\gamma$  besondere Bedeutung zu.<sup>31,32</sup>

PPAR $\delta$  zeichnet sich durch eine weite Verbreitung in beinahe allen menschlichen Geweben aus. Nach Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor und nach Bindung spezifischer Liganden steuern alle drei PPAR-Isoformen die Expression nachgeschalteter Zielgene mit unterschiedlichen, hochgradig zellartspezifischen Funktionen im Bereich der zellulären Proliferation und Differenzierung.<sup>33</sup> Mittlerweile existieren für alle drei PPAR-Isoformen spezifische, synthetisch hergestellte Agonisten und Antagonisten. Als hochpotenter synthetischer Aktivator von PPAR $\delta$  konnte beispielsweise L-165041 identifiziert werden. Auch GW501516 ist ein hochspezifischer PPAR $\delta$ -Agonist. Die Funktionen von PPAR $\delta$  sind extrem vielfältig und entstammen unter anderem den Bereichen Embryoimplantation, Myelinisierung, Lipidmetabolismus und Adipositaspathogenese.<sup>34</sup> Als stark proinflammatorisch wirksamer und durch TNF $\alpha$  induzierbarer Faktor wird PPAR $\delta$  auch eine Schlüsselfunktion bei der Wundheilung zugeschrieben. PPAR $\delta$  gilt dabei als Vermittler einer gesteigerten Keratinozytenproliferation. Im Hinblick auf die Psoriasispathogenese wird eine PPAR $\delta$ -induzierte keratinozytäre Hyperproliferation mit starker Ähnlichkeit zur hyperproliferativen Phase der Wundheilung diskutiert.<sup>7,24,35-38</sup>

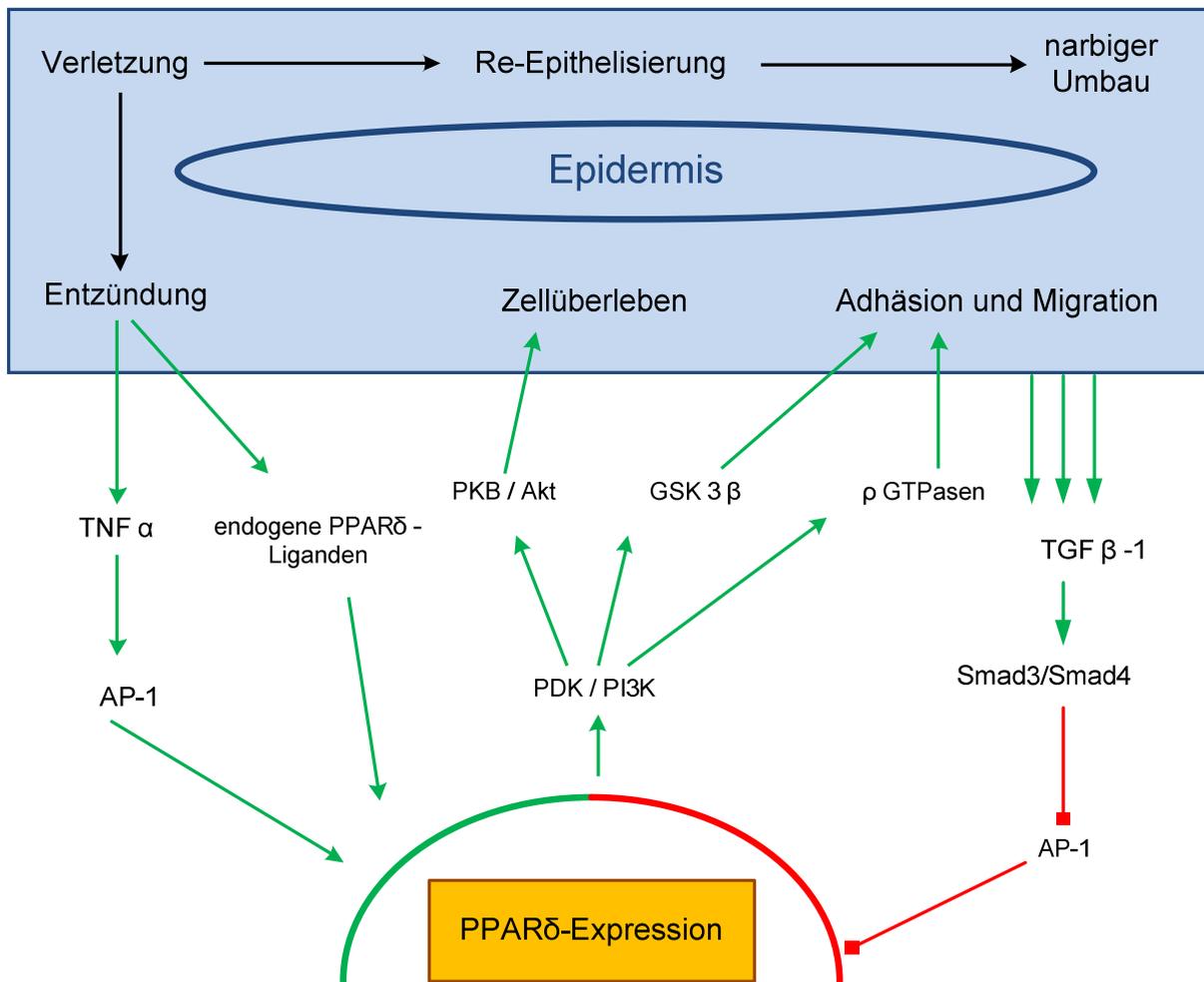
Die Expression aller drei PPAR-Unterformen wurde in Keratinozyten nachgewiesen, wobei PPAR $\delta$  vielseitigere epidermalbiologische Funktionen als den anderen Isoformen zukommen.

### **1.3.1. PPARs in der epidermalen Biologie**

Alle drei PPAR-Isoformen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der fetalen Entwicklung in der Haut von Mäusen exprimiert und nehmen nach der Geburt

in ihrer Konzentration stark ab. In der gesunden adulten interfollikulären Epidermis sind PPARs nicht nachweisbar<sup>38</sup> – anders als in Haarfollikeln und Schweißdrüsen, in denen PPARs wichtige Funktionen bei Wachstum und Differenzierung dieser Strukturen zukommt.<sup>39,40</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von PPAR $\alpha$  und PPAR $\delta$  durch externe Stimuli wie chemische Irritation, Haarpflegen und Verwundung reaktiviert werden kann. Besonders die Expression von PPAR $\delta$  ist in der Haut an Wundrändern stark erhöht, wobei diese sich nach abgeschlossener Wundheilung normalisiert. Heterozygote PPAR $\delta$  +/- Mäuse weisen eine verzögerte Wundheilung mit gestörter Keratinozytenmigration und -proliferation auf.<sup>38</sup> Die starke Initiierung von PPAR $\delta$  während der Wundheilung konnte auf das inflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  zurückgeführt werden, welches an eine Activator Protein-1 (AP-1) Domäne des genomischen PPAR $\delta$ -Promoters bindet und so die PPAR $\delta$ -Expression anregt. Außerdem triggert TNF $\alpha$  die Produktion von PPAR $\delta$ -Liganden in Keratinozyten. Die gesteigerte intrazelluläre Konzentration von PPAR $\delta$  bewirkt daraufhin eine verminderte Aktivität von Akt1 und resultiert in einer gesteigerten Expression von Genen mit antiapoptotischer Wirkung. Gleichzeitig fördert PPAR $\delta$  die Expression von Genen der Keratinozytendifferenzierung. PPAR $\delta$  sichert somit das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl an Keratinozyten im Wundrandbereich sowie deren schnelle Proliferation und Differenzierung.<sup>41,6</sup> Eine Terminierung der PPAR $\delta$ -bedingten gesteigerten Keratinozytenproliferation wird durch TGF- $\beta$ 1 und Smad3 bewirkt und findet in der späten Reepithelisationsphase statt. Dabei behindert TGF- $\beta$ 1/Smad3 die AP-1 gesteuerte Aktivierung des PPAR $\delta$ -Promoters.<sup>36</sup> Smad3 Knock-down Mäuse zeigen eine überschießende Wundheilung mit persistierender PPAR $\delta$ -Expression.<sup>24</sup> Es konnte weiterhin eine starke Expression von PPAR $\delta$  in der interfollikulären Epidermis von psoriatischen Plaques gezeigt werden.<sup>42</sup> Abbildung 2 stellt die komplexe Funktion von PPAR $\delta$  während der Wundheilung schematisch dar. Diese verstärkte Expression ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das proinflammatorische Zytokinmuster der psoriatischen Epidermis mit dem Schlüsselenzym TNF $\alpha$  zurückzuführen. Es bestehen zahlreiche funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen der PPAR $\delta$ -induzierten keratinozytären Hyperproliferation während der Wundheilung und der entzündlichen Hyperproliferation der psoriatischen Epidermis. Ein pathogenetisches Konzept der Psoriasis als maßgeblich durch PPAR $\delta$  mitbedingte überschießende Wundheilungs-

reaktion wird bereits diskutiert. Besonders auf das Kőbner-Phänomen lässt sich ein derartiger Erklärungsansatz schlüssig anwenden.



**Abbildung 2: Die Rolle von PPARδ während der Wundheilung**

Nach einer Verletzung wird die Expression des PPARδ-Gens durch die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an den PPARδ-Promoter induziert. Diese Bindung wird vornehmlich durch das proinflammatorische Zytokin TNFα bewirkt. Die verstärkte Konzentration von TNFα und weiteren inflammatorischen Zytokinen regt gleichzeitig die Produktion endogener PPARδ-Liganden an. Das aktivierte PPARδ-Protein bewirkt nachfolgend die Transkription von Genen der ILK (integrin linked kinase) und der PDK-1(3-phosphoinostide dependent kinase-1). Dies resultiert in einer Aktivierung des antiapoptotischen PKBα-/ Akt-1-Signalweges.

Terminiert wird die TNFα-induzierte Stimulation von PPARδ durch den TGFβ-1 (transforming growth factor beta – 1). Dieser führt über Smad3/Smad4 zu einer Blockade der AP-1-Wirkung am PPARδ-Promoter (Abbildung nach Yessoufou et Wahli, 2010).<sup>24</sup>

### 1.3.2. PPAR $\delta$ und Psoriasis

Die Expression von PPAR $\delta$  auf mRNA- und Proteinebene ist in psoriatischen Plaques im Vergleich zu normaler Kontrollhaut deutlich erhöht,<sup>42</sup> wobei sowohl basale als auch suprabasale Keratinozyten PPAR $\delta$  exprimieren.<sup>43</sup>

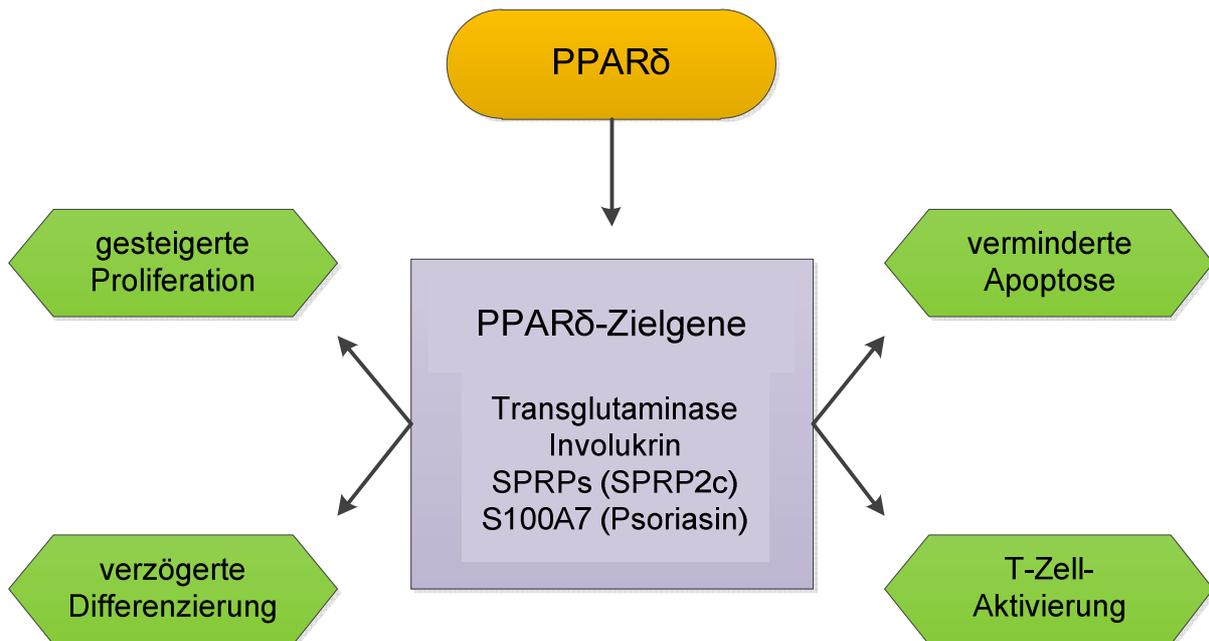
PPAR $\delta$  wirkt in der psoriatischen Epidermis als Regulator der Keratinozytendifferenzierung, der Keratinozytenproliferation<sup>44</sup> und induziert eine verstärkte Angiogenese.<sup>45</sup>

Die Expression der fettsäurebindenden Proteine FABP5<sup>46</sup> und CRABP2,<sup>47</sup> welche dem Transport der PPAR $\delta$ -Liganden an den Transkriptionsfaktor dienen (siehe Abbildung 1), ist in psoriatischen Plaques ebenso erhöht.<sup>48</sup> FABP5 interagiert spezifisch mit PPAR $\delta$ <sup>41</sup> und ist in Modellen einer schnell proliferierenden Epidermis verstärkt nachweisbar. CRABP2 wird auch als eigenständiger PPAR $\delta$ -Aktivator diskutiert. Neben den zum Fettsäuretransport dienenden Proteinen konnte auch die Akkumulation von Lipoxygenaseprodukten, den eigentlichen PPAR $\delta$ -Liganden, in psoriatischer Epidermis gezeigt werden.<sup>49</sup>

Wie bereits im vorangestellten Absatz diskutiert, erfolgt die Aktivierung der PPAR $\delta$ -Expression im entzündlichen Milieu durch das Zytokin TNF $\alpha$ . Die Überexpression von TNF $\alpha$  in psoriatischen Plaques konnte mehrfach gezeigt werden und die Schlüsselfunktion des Zytokins als entscheidender Entzündungsmediator der Psoriasis ist unumstritten. Eine Blockade der TNF $\alpha$ -vermittelten Entzündungsantwort mittels der Biologika Infliximab und Etanercept führt in vivo zu einer markanten Verbesserung des Krankheitsbildes.<sup>50</sup> In der Zusammenschau ergibt sich das Bild von PPAR $\delta$  als vermittelndem Schlüsselement zwischen der TNF $\alpha$ -dominierten entzündlichen Immunreaktion einerseits und der histologisch sichtbaren keratinozytären Hyperproliferation andererseits. Die weitestgehende Beseitigung der psoriatischen Hyperkeratose durch funktionelle Ausschaltung von TNF $\alpha$  durch Biologika könnte somit als Unterbrechung einer Übertragung der entzündlichen Veränderungen auf die Keratinozyten durch einen Wegfall der PPAR $\delta$ -induzierten Genaktivierung betrachtet werden.

PPAR $\delta$  agiert in mehrerer Hinsicht als direkter Gegenspieler von PPAR $\gamma$  oder vermittelt durch dieselben Liganden medierte konträre Funktionen.<sup>51</sup> Im Hinblick auf die antagonistischen Wirkungsweisen der beiden Transkriptionsfaktoren weist die Tatsache, dass lediglich die PPAR $\gamma$ -Aktivierung mit einer Verbesserung des psoriatischen Phänotyps einhergeht,<sup>23,52</sup> auf die Bedeutung von PPAR $\delta$  als

Aggravateur der Psoriasis hin. Über die Regulation der Transkription welcher Zielgene genau PPAR $\delta$  seine proliferationsfördernde Wirkung auf Keratinozyten ausübt, ist noch wenig erforscht. Ein wichtiges Ergebnis dieser Doktorarbeit liegt in der Identifikation von weiteren Zielgenen von PPAR $\delta$ . Abbildung 3 fasst die bekannten PPAR $\delta$ -vermittelten epidermalen Veränderungen bei der Psoriasis zusammen.



**Abbildung 3: Wirkungsprofil von PPAR $\delta$  über die Aktivierung von Zielgenen in psoriatischer Haut**

Nach der Aktivierung von PPAR $\delta$  kommt es zur verstärkten Expression von PPAR $\delta$ -Zielgenen. Bekannte psoriasisassoziierte PPAR $\delta$ -Zielgene sind u.a. die Transglutaminase, Involukrin, SPRP2c (ser-protease-related protein 2c) und das zur S100-Familie gehörende chemotaktische Protein Psoriasis (S100A7). Diese und weitere Zielgene vermitteln die typischen, PPAR $\delta$ -induzierten, Merkmale der psoriatischen Epidermis. Diese umfassen auf der Keratinozytenebene eine gesteigerte Proliferation, eine verzögerte terminale Differenzierung und eine verminderte Apoptoserate. Zusätzlich kommt es zu einer hauptsächlich durch Psoriasisin vermittelten Aktivierung von T-Zellen.<sup>53</sup>

#### **1.4. Methoden der Kultivierung und funktionellen Charakterisierung der Genexpression in primären Keratinozyten und Fibroblasten**

Um die Rolle der Keratinozyten in der Pathogenese der Psoriasis genauer zu untersuchen und um eine funktionelle Charakterisierung der Genexpression vorzunehmen, ist es unerlässlich, diese Zellen unter standardisierten Bedingungen in Kultur zu halten und beliebig vermehren zu können. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit

liegt somit auf der Etablierung einer Methode zur Anzucht und quantitativ ausreichenden Vermehrung von läsionalen und nicht läsionalen humanen Keratinozyten psoriatischer Spender sowie von gesunder Kontrollhaut. Aussagen über die Genexpression in den psoriatischen Zellen sollten sowohl mittels Anwendung der RT-PCR als auch durch die Durchführung zweier Microarray-Analysen generiert werden. Zusätzlich wurde das Ziel der Etablierung einer Methode zur effizienten lentiviralen Transfektion für die Durchführung von Gentransduktionsversuchen verfolgt. Die Etablierung der primären Keratinozyten-Zellkultur stellt die notwendige Voraussetzung für die Durchführung aller geplanten Genexpressionsuntersuchungen dar und ist daher von eminenter Wichtigkeit.

Primäre Keratinozyten gelten als besonders anspruchsvolle Zellen, die sich nur schwer kultivieren lassen. Die vor mehr als dreißig Jahren durch Rheinwald und Green erstmals vorgestellte Methode zur Kultivierung humaner Keratinozyten in vitro gilt auch heute noch als Goldstandard unter den mittlerweile vielfältigen Techniken der Keratinozytenkultur.<sup>54</sup>

#### **1.4.1. Kulturverfahren nach Rheinwald und Green**

Das Rheinwaldsche Verfahren basiert auf der Verwendung von teilungsunfähigen murinen 3T3-Fibroblasten als sog. „Feeder Layer“ für die primären Keratinozyten und wurde in den ersten Jahren seiner Anwendung durch Zugabe von proliferationsfördernden Wachstumsfaktoren in das Kulturmedium wesentlich verbessert. Die Methode der Co-Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten hat dabei zu wichtigen Erkenntnissen über die wachstumsfördernde Funktion der Fibroblasten geführt.

#### **1.4.2. Methoden der Charakterisierung der Genexpression primärer Zellen**

##### *1.4.2.1 Abbildende Verfahren*

Die klassischen Methoden zur experimentellen Untersuchung der Expression von bestimmten Genen in Zellen sind die RT-PCR, welche spezifische mRNA nachweist, der Western Blot zur Detektion von Proteinen sowie der Southern und Northern Blot. Ein bedeutsames neueres Verfahren stellt die besonders effiziente und zeitsparende Microarray-Technologie dar.

#### 1.4.2.2 *Microarray-Technologie*

Seit der Vorstellung der Microarray-Technologie und deren erster Anwendung in der experimentellen Forschung in der Mitte der 1990er Jahre,<sup>55</sup> stellt das Verfahren eine der wichtigsten Methoden zur Durchführung von Genexpressionsstudien, Genregulationsuntersuchungen und Genfunktionsbestimmungen dar. Microarrays tragen entscheidend zur Nutzbarmachung der Sequenzierungsergebnisse des „Human Genome Projects“ bei und bergen ein enormes Potential für die Erforschung von pathologischen Genregulationsprozessen wie beispielsweise der Kanzerogenese,<sup>56</sup> der Wirkstoffidentifikation und Medikamentenforschung<sup>57</sup> sowie von populationsgenetischen Fragestellungen.<sup>58</sup> Auch auf dem Gebiet der Autoimmunforschung werden Microarray-Studien mit sehr gutem Erkenntnisgewinn eingesetzt.<sup>59</sup>

Das Ziel der Microarray-Genexpressionsstudien liegt in dem Vergleich des Expressionsniveaus von bestimmten Genen in verschiedenen definierten Zuständen wie Gesundheit, Krankheit oder nach einer therapeutischen Intervention. Die Genfunktionsanalyse beurteilt die Genexpression aber auch in Hinblick auf deren Beziehung zu bestimmten zellulären Signalwegen wie zum Beispiel der Apoptose.<sup>60</sup> Microarrays stellen eine geordnete Abfolge von komplementär gelesenen spezifischen Genfragmenten auf einem geeigneten Trägermaterial wie beispielsweise Nitrozellulose, Silikon oder Glas dar und ermöglichen den Nachweis der einzelnen Gene in dem Untersuchungsmaterial durch deren Bindung an den komplementären Nukleinsäurestrang auf der Platte. Bei einem Microarray verfügt jedes zu untersuchende Gen über einen definierten Bindungsort auf der Platte. Jedes Gen wird durch einen gleich langen Komplementärstrang repräsentiert. Dies erlaubt die akkurate Genidentifikation bei der Auswertung.<sup>55</sup> Der Begriff „target“ (engl.: Ziel) bezeichnet dabei den auf der Trägereinheit aufgebracht Komplementärstrang und der Begriff „probe“ (engl.: Sonde) die freie Nukleinsäure im Untersuchungsmaterial.<sup>61</sup> Das „target“ kann die genetische Information dabei sowohl in Form von cDNA, mRNA oder Proteinen repräsentieren, wobei cDNA-Micoarrays die mit Abstand häufigste Anwendungsform darstellen. Diese Microarrays erlauben die quantitative Analyse der Transkription relevanter Gene in RNA-Moleküle. Die RNA wird für den Array mittels Enzymen in cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei der anschließenden Hybridisierung von „target“ und „probe“ erfolgt die spezifische Bindung der Nukleinsäurestränge. Die Intensität

des Fluoreszenzsignals der einzelnen Positionen auf dem Array wird mittels Laser ermittelt. Die Auswertung der gewonnenen Daten beinhaltet die Normalisierung zum Ausgleich von verschiedenen Bias-Quellen und stellt ein biostatistisch höchst anspruchsvolles Verfahren dar. Die Nutzbarmachung der erhaltenen Informationen erfolgt durch die Einteilung der exprimierten Gene in – im Vergleich zu einem Durchschnittswert – über- oder unterexprimierte Gene sowie deren Einteilung in funktionelle Gruppen.<sup>62</sup>

#### *1.4.2.3 Microarray-Technologie in der dermatologischen Forschung*

Für die dermatologische Forschung stellt die Microarray-Technologie heute eine unverzichtbare Methode dar und sie trägt entscheidend zur erfolgreichen Erforschung komplexer dermatologischer Krankheitsbilder bei.<sup>63</sup> Das maligne Melanom wurde als einer der ersten humanen Tumoren mit großem Erkenntnisgewinn über tumorspezifische Gendysregulation, Progressionsfaktoren und mögliche Therapieansätze mittels Microarray untersucht.<sup>64</sup>

Mittlerweile existieren bereits mehrere Publikationen über Microarray-Studien von aus psoriatischer Haut isoliertem Material,<sup>17,48,65-67</sup> wobei es sich meist um Vergleiche der Genexpression in läsionaler versus nicht-läsionaler psoriatischer Haut sowie von gesunder Kontrollhaut handelt. Diese Expressionsstudien führten zur Entdeckung zahlreicher funktionell wichtiger Gene in der Psoriasispathogenese und erleichterten die Lokalisation von Psoriasis-suszeptibilitätsloki im Genom. Eine bedeutende Studie wurde 2003 von Zhou et al. publiziert.<sup>48</sup> Eingesetzt wurde dabei der U95A-E Microarray von Affymetrix mit Bindungsdomänen für 63.100 humane Gene. Im Vergleich von läsionaler und nicht-läsionaler Haut wurden 1.300 Gene mit veränderter Expression gefunden, wobei die Studie sich auf 131 Gene mit Funktionen im Bereich Immunregulation und Immunantwort konzentrierte. Insgesamt 11 bisher nicht mit Psoriasis in Verbindung gebrachte Zytokine, wie beispielsweise das small inducible cytokine (SYC) A19, SYC A21 und der stromal cell derived factor (SCDF), konnten identifiziert werden.<sup>63</sup> Andere Studien beschäftigten sich mit Teilaspekten der Psoriasis wie der Psoriasisarthritis.<sup>68</sup> Im Rahmen des sogenannten GAIN-Projekts (Genetic association Information Network)<sup>69</sup> erfolgte die bisher größte Microarray-Studie zur Psoriasis.

In Hinblick auf die Zukunft haben die erfolgreichen Anwendungen von Microarrays in Forschung und Diagnostik auch Hoffnungen auf therapeutische Neuerungen durch

Eingriffe in die Expression einzelner Gene geweckt. Im Zentrum der Aufmerksamkeit steht dabei die RNAi-Technologie. Diese Arbeit stellt eine praktikable Methode zur erfolgreichen siRNA-Transfektion von humanen Keratinozyten mittels lentiviralen Vektoren vor und trägt so zur Nutzbarmachung der RNAi-Technologie für die Erforschung der Psoriasispathogenese bei.

### **1.4.3. Manipulative Verfahren**

#### *1.4.3.1 RNA-Interferenz (RNAi)*

Der translationsinhibierende Effekt der RNAi-Technik basiert auf einer 21 bis 23-gliedrigen Nukleotidkette, deren Sequenz komplementär zu der Sequenz des Zielgens ist, der sogenannten short interfering RNA (siRNA). An beiden Enden der siRNA befinden sich jeweils zwei überstehende Nukleotide. Die siRNA wird im Zytosol der Zelle durch Spaltung aus einem größeren doppelsträngigen RNA-Molekül gebildet. Das für diese Spaltung verantwortliche Enzym wird „dicer“ genannt und entspricht einer Ribonuklease.

Zentrales Element der RNA-Interferenz ist ein als RNA-induced silencing complex (RISC) bezeichneter Enzymkomplex. Für die Funktion des Enzymkomplexes sind Proteine der Argonaut-Familie verantwortlich. Die Bildung des RISC ist ein mehrstufiger Prozess und findet in den zytosolischen processing-bodies (p-bodies) statt. Die durch das Enzym „dicer“ gespaltenen siRNA-Moleküle werden dabei zunächst an die Argonautenproteine des RISC übertragen, woraufhin der sogenannte Prä-RISC entsteht. Innerhalb des Prä-RISC werden die Doppelstränge der gebundenen siRNA entwunden und in Einzelstränge aufgespalten. Nur einer der beiden RNA-Einzelstränge verbleibt anschließend als sogenannter Leitstrang innerhalb des RISC. Als Leitstrang fungiert in der Regel derjenige RNA-Einzelstrang mit der höheren thermodynamischen Stabilität am 5'-Ende. Der zweite RNA-Einzelstrang verlässt den RISC und wird im Zytosol abgebaut. Der Komplex aus Prä-RISC und RNA-Leitstrang wird nunmehr als Holo-RISC bezeichnet. Nunmehr kann eine zu dem Leitstrang komplementäre Ziel-mRNA an den Leitstrang gebunden und somit in den RISC integriert werden.

Über diese Aktivierung des RISC kommt es zu einer spezifischen Ausschaltung der Translation der Ziel-mRNA direkt am Ribosom. Als mögliche Mechanismen der Translationshemmung wird dabei eine RISC-vermittelte Protein-Protein-

Wechselwirkung mit nachfolgender Blockade der Translationsinitialisierungsfaktoren diskutiert. Auch ein RISC-induzierter Abbau des Polyadenylierungssignals der mRNA wird diskutiert.<sup>70</sup>

Um den beschriebenen Wirkmechanismus entfalten zu können, benötigt die siRNA allerdings Hilfestellung bei der Penetration des Zellinneren. Ein einfaches Anreichern der Zellumgebung, beispielsweise durch Hinzugabe in das Kulturmedium, mit siRNA-Nukleotidketten reicht dazu nicht aus, da die „nackte“ RNA Zellmembranen nicht passieren kann. Zur Anwendung der RNAi-Technik in Zellkulturen und auch zur möglichen Gentherapie an lebenden Organismen stellt die stabile Einbringung der siRNA in das Zellinnere die größte Herausforderung dar.

#### *1.4.3.2 Virale Vektoren*

Eine weitere verbreitete Technik zur Überwindung der Membranbarriere liegt in der Verwendung von Viren als siRNA-tragende Vektoren, wobei Retroviren als erste Virenspezies für dieses Verfahren eingesetzt wurden. Heute kommen neben diesen auch Adenoviren und Onkoviren, aber hauptsächlich replikationsdefiziente HIV-assoziierte Lentiviren zum Einsatz. Ausgenutzt wird dabei die Fähigkeit dieser Viren, ihre genetische Information stabil in das Genom der Zielzelle zu integrieren und die zelleigene Maschinerie für die Überführung der eingebrachten Gene in mRNA und Protein zu nutzen.<sup>71</sup> Durch molekularbiologische Klonierungsverfahren unter Zuhilfenahme von Restriktionsenzymen ist es möglich, eine für ein gewünschtes Gen komplementäre cDNA in das Genom eines viralen Vektors zu integrieren und als siRNA wirksam werden zu lassen. Wird der cDNA-tragende virale Vektor nämlich in eine Zielzelle eingebracht und integriert sich diese cDNA stabil in das Zielzellgenom, so erfolgt die Bildung einer mRNA aus der fremden cDNA. Diese mRNA ist komplementär zu der mRNA des Gens, dessen Ausschaltung beabsichtigt ist, und blockiert durch spezifische Anbindung die Proteinbildung. Die besondere Attraktivität von lentiviralen Vektoren liegt dabei in der guten Manipulierbarkeit des viralen Genoms sowie in der Möglichkeit, auch längere DNA-Sequenzen (bis zu 8kb) in dieses zu integrieren und durch Transfektion irreversibel in das Genom von Zielzellen zu integrieren. Dabei besitzen Lentiviren die besondere Fähigkeit, sowohl teilungsaktive als auch nicht-mitotische Zellen zu infizieren.<sup>72</sup> Zusätzlich aktivieren Lentiviren bei der Infektion von Zielgeweben nicht die Interferonkaskade und lösen somit keine unerwünschte proinflammatorische Umgebungsreaktion aus. Heute ist es

möglich, lentivirale Suspensionen mit Titern im Bereich von  $10^7$  bis  $10^8$  infektiösen Viruspartikeln pro Milliliter herzustellen. Mittels dieser hochtitrigen Virussuspensionen ist heute die Anwendung lentiviraler Vektoren zur Herstellung von stabil transgenen Zellkulturen, Mäusemodellen und sogar Nutztieren realisiert worden. Auch innerhalb der komplexen Problematik der Nutzbarmachung viraler Gentransduktionstechniken innerhalb der Bemühungen um eine Gentherapie am Menschen stellen lentivirale Vektoren auf Grund ihrer gegenüber herkömmlichen Retroviren günstigen Eigenschaften im humanen Organismus eine Hoffnungsquelle dar. Auch zahlreiche dermatologische Erkrankungen mit genetischer Ursache, wie beispielsweise die Xeroderma pigmentosa (XP) oder die Epidermolysis bullosa (EB), sind nach heutiger Erkenntnis Kandidaten für einen kurativen Therapieansatz durch Gentransduktion mittels viralem Transport in der Zukunft. Die Generierung und Verbreitung von Verfahren zur Einbringung viraler Vektoren in Keratinozyten gehören zu den zahlreichen notwendigen Voraussetzungen für die Realisierung dieser visionären Ideen.

Diese Doktorarbeit befasst sich unter anderem mit der Etablierung einer Methode zur Anwendung der RNAi-Technik in primären Keratinozyten. Es wurde ein erfolgreiches Verfahren zur Infektion von primären Keratinozyten mit lentiviralen Vektoren in unserem Labor eingeführt. Durch die erfolgreiche Infektion von Keratinozyten mit siRNA-tragenden Lentiviren können nunmehr gezielt Gene mit gesicherter oder vermuteter Relevanz für die Pathogenese der Erkrankung funktionell inhibiert werden. Auf diese Weise können, besser als durch allein abbildende Verfahren, Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung dieser Gene innerhalb eines komplexen pathogenetischen Systems gezogen werden.

#### *1.4.3.3 Transfektion primärer humaner Keratinozyten und Fibroblasten mittels lentiviraler Vektoren*

Um die RNAi-Technik in unserem Labor zur gezielten funktionellen Charakterisierung psoriasisrelevanter Gene einzusetzen, ist die Etablierung einer anwendbaren Methode zur effizienten Infektion von primären psoriatischen Keratinozyten mit viralen Vektoren unerlässlich. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass lentivirale Vektoren den adenoviralen und oncoretroviralen Vektoren bei der Anwendung an primären epithelialen Zellen und an Keratinozyten im Besonderen überlegen sind.<sup>73,74</sup> Lentivirale Vektoren besitzen als einzige unter den üblichen

viralen Vektoren die Fähigkeit, auch nicht-mitotische Zellen in vitro stabil mit einem Transgen zu infizieren. Die erfolgreiche Infektion und die dauerhafte Expression von lentiviral vermittelten Transgenen konnten bereits in hämatopoetischen Stammzellen, Leberzellen, Neuronen und Muskelzellen nachgewiesen werden.<sup>75,76</sup> Auch primäre humane Keratinozyten konnten mittels verschiedener Methoden stabil mit lentiviralen Vektoren infiziert werden.<sup>77,73,78</sup> Diese Protokolle zur Infektion von Keratinozyten beziehen sich dabei hauptsächlich auf neonatale Vorhautkeratinozyten<sup>77</sup> oder auf normale adulte humane Keratinozyten ohne einen pathologischen Phänotyp. Insbesondere die neonatalen Keratinozyten weisen eine hohe basale Teilungsrate in vitro auf und lassen sich dadurch einfacher mit viralen Vektoren infizieren. Durch simple Inkubation mit virushaltigem Medium wurden Infektionsraten von über 90% der eingesetzten Zellen erreicht.<sup>78</sup> Wir haben beobachtet, dass sich ein derart einfaches Verfahren nicht auf adulte humane Keratinozyten mit psoriatischen Phänotyp übertragen lässt. Diese adulten Zellen weisen eine in vitro sehr viel langsamere basale Teilungsrate als neonatale Vorhautkeratinozyten auf und werden anders als diese mittels besonders aufwändigen Kulturtechniken gehalten. Ein bekanntes Charakteristikum der hier verwendeten Kulturmethode ist die Proliferationshemmung der Keratinozyten im Inneren von größeren Zellkolonien. Diese mitotisch nicht aktiven Zellen sind einer viralen Infektion sehr viel weniger zugänglich als neonatale Zellen, die zumeist unter weniger anspruchsvollen Kulturbedingungen flächenhaft wachsen. Adulte humane Keratinozyten benötigen, um annähernd gleichwertige Infektionsraten zu erzielen, sehr viel aufwendigere Infektionsverfahren. Serrano et al. stellten 2003 eine Methode zur effizienten Infektion adulter humaner Keratinozyten aus Rheinwald- und Green-Kulturen mittels der Anwendung von Zentrifugation zur Konzentration der Viruspartikel auf der Keratinozytenoberfläche vor.<sup>73</sup> Dieses sogenannte „Spinokkulations-Verfahren“ konnten wir in einer individuell modifizierten Weise auf unsere psoriatischen Keratinozyten übertragen und über 70% der eingesetzten Keratinozyten mit lentiviralen Vektoren infizieren. Die erfolgreiche Anwendung des RNAi-Verfahrens in den psoriatischen Keratinozyten konnte mittels RT-PCR bestätigt werden. Es ist der Arbeitsgruppe damit möglich geworden, psoriatische Keratinozyten effizient mit lentiviralen Vektoren zu infizieren und so durch RNAi gezielt die Expression von bestimmten Genen zu unterdrücken. Die Verfügbarkeit dieser neuen Methode zur Untersuchung der Funktion von Genen ist eine qualitativ hochwertige Neuerung und

ermöglicht über das bisherige Maß hinaus die funktionelle Charakterisierung von Psoriasis-kandidatengenen in phänotyptragenden Zellkulturen.

## **1.5. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe**

### **1.5.1. Genexpressionsstudien mittels Affymetrix HG\_U95A**

Durch unsere Arbeitsgruppe wurden eigene Genexpressionsstudien mit dem Ziel der Detektion psoriasis-spezifischer Kandidatengene mittels Microarray-Technologie durchgeführt. Hierfür wurden Proben aus psoriatischen Plaques und an atopischem Ekzem und Kontaktallergie erkrankter Haut mittels des Microarray-Chips U95A von Affymetrix untersucht.<sup>17</sup> In der statistischen Auswertung wurden die Gene mit alleiniger oder mindestens zweifacher, statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den anderen Erkrankungen verstärkten Über- bzw. Unterexpression in der läsionalen Psoriasis herausgefiltert. Diese Gene können als Transkripte mit spezifischer Relevanz für die Psoriasispathogenese angesehen werden.

Bei der Einteilung der ermittelten psoriasis-spezifischen Gene in funktionelle Gruppen fiel auf, dass die Mehrzahl dieser Gene dem Bereich des Fettsäurestoffwechsels und der Fettsäuresignalkaskade entstammt. Die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  zeigte sich etwa 10fach erhöht und Gene mit nachgewiesener Verbindung zu PPAR $\beta$ , wie FABP5, CRABP2 und ALOX12 zeigten sich ebenfalls psoriasis-spezifisch überexprimiert. Aktivatoren des PPAR $\delta$ -antagonisierenden Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  zeigten hingegen eine verminderte Expression. Die Ergebnisse unserer Expressionsuntersuchung decken sich zu über 80% mit bereits aus anderen Genexpressionsstudien bekannten Resultaten.<sup>48</sup>

In der Zusammenschau weisen unsere Ergebnisse – in Übereinstimmung mit Zhou et al.<sup>48</sup> – auf das Vorhandensein einer hochgradig bedeutenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  in psoriatischer Haut hin. Weitere psoriasis-spezifisch regulierte Gene entstammten funktionellen Gruppen mit bekannter psoriasispathogenetischer Relevanz wie der Interferonsignalkaskade, der DC-Zellfunktion und der Wundheilung.

Einige Gene, darunter das in den psoriatischen Proben um den Faktor 4.5 verstärkt exprimierte Gen WNT5a, konnten nicht in eine der bisher bekannten funktionell relevanten Gruppen eingeteilt werden. Eine Mitbeteiligung von WNT 5a an der Psoriasispathogenese wurde bereits vermutet.<sup>79,80</sup> Von besonderem Interesse ist

dabei die Beobachtung, dass WNT5a offenbar zu einer Verstärkung der Interferonkaskade führt<sup>81</sup> und somit indirekt auch zu einer Überexpression von PPAR $\delta$  führen könnte. Eine neben dem bekannten TNF $\alpha$ -induzierten Signalweg existierende, WNT5a-medierte Expressionsverstärkung von PPAR $\delta$  mit pathophysiologischer Relevanz für die Psoriasis erscheint somit denkbar. Auch eine migrationsfördernde Wirkung von WNT 5a auf Zellen wurde beschrieben.<sup>82</sup> In Bezug auf die Psoriasispathogenese kann somit auf eine Mitbeteiligung von WNT5a an der Beschleunigung der Keratinozytenmigration von Stratum basale zum Stratum corneum der Epidermis zurückgeschlossen werden. Auch eine Unterdrückung des funktionellen PPAR $\delta$ -Antagonisten PPAR $\gamma$  durch WNT5a wurde bereits beschrieben.<sup>83</sup>

### **1.5.2. Etablierung lentiviraler Vektoren**

Parallel zu meinen Arbeiten an der Etablierung der primären Keratinozyten-Zellkultur etablierte unsere Arbeitsgruppe erfolgreiche eine Methode zur Produktion eines lentiviralen Vektors zur Infektion von primären Zellen. Der verwendete Transfervektor pLentiLox3.7 (pLL3.7) wurde bereits früher erfolgreich in Gentransduktions-experimenten-verwendet.<sup>84</sup> Die Produktion des Virussystems erfolgte unter Verwendung mehrerer Packaging Plasmide der dritten Generation und basierte wesentlich auf der Beschreibung von Trono et al.<sup>85</sup> Als Transfektionszellen zum „Zusammenbau“ der infektiösen lentiviralen Vektoren dienten 293T/17-Zellen. Die Bestimmung des erzielten Virustiters erfolgte durch FACS-Analysen infizierter HeLa-Zellen. Dabei wurde die Expression des Reportergens GFP (Green Fluorescent Protein) spezifisch in den infizierten Zellen nachgewiesen. Eine Aufkonzentrierung der Virussuspensionen erfolgte mittels eines modifizierten Ultrazentrifugationsprotokolls. Nach Abschluss der Protokolloptimierungen konnten Virustiter bis zu  $10^7$  infektiöse Partikel pro Milliliter erzielt werden. Das genaue Verfahren kann in der diesbezüglichen Publikation von Al Yacoub et al. nachgelesen werden.<sup>86</sup>

Durch molekularbiologische Klonierungsverfahren gelang es unserer Arbeitsgruppe, für mehrere durch uns beforschte Gene wie PPAR $\delta$  oder  $\beta$ -Catenin spezifische shRNA (short hairpin RNA) in den Transfervektor pLL3.7 zu integrieren und somit ein funktionsfähiges Verfahren zur Herunterregulation genspezifischer mRNA in

Zielzellen zu schaffen. Die notwendigen Voraussetzungen zur Etablierung einer Methode zur erfolgreichen Einbringung der lentiviralen Vektoren in primäre Keratinozyten waren somit vorhanden und werden in dieser Promotionschrift dargestellt.

## **1.6. Zielstellung dieser Promotionsarbeit**

Das Ziel der hier vorliegenden experimentellen Promotionsarbeit liegt in dem Neuaufbau einer primären Zellkultur von läsionalen und nicht läsionalen humanen Keratinozyten und Fibroblasten aus psoriatischer Spenderhaut. Im Folgenden soll in diesen Zellen die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  und dessen Relevanz für die Pathogenese der Psoriasis näher bestimmt werden. Zu diesem Zweck soll nach erfolgreicher Kulturetablierung die in den vorangegangenen Microarray-Studien beobachtete Überexpression von PPAR $\delta$  mittels RT-PCR für läsionale Fibroblasten bestätigt werden. Weiterhin soll die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors in psoriatischen Keratinozyten mittels Stimulationsexperimenten und Genexpressionsanalysen nach Aktivierung von PPAR $\delta$  untersucht werden

Des Weiteren sollte ein Verfahren zur Transduktion primärer humaner Keratinozyten und Fibroblasten mit shRNA-tragenden, replikationsdefizienten, HIV-assoziierten Lentiviren etabliert werden, um die funktionelle Bedeutung von PPAR $\delta$  und weiteren Genen durch deren spezifische Ausschaltung in primären Zellkulturen untersuchen zu können.

## 2. Material

### 2.1. Materialien und Geräte

Autoclave (Varioklav 75S)	H+P Labortechnik
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	BD Biosciences
Elektrophoreseeinheit (Power Supply EPS600)	Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammern	BioRad Laboratories
Elektrophoresesystem (Easy-Cast; B1)	Owl Scientific, Inc
Elektrophoresesystem (Easy-Cast; B2)	Owl Scientific, Inc
Fluorometer (Qubit)	Invitrogen
Inkubator (IG150)	Jouan GmbH
Pipetten (2µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf
Plastikmaterialien (Zellkultur)	Greiner bzw. Corning
Sterilwerkbank (Holten LaminAir)	Jouan GmbH
Schüttelinkubator 37°C (Innova 4000)	New Brunswick Scientific
Thermocycler (PTC-200)	MJ Research
Thermomixer Compact	Eppendorf
UV-Photometer (GeneRay)	Biometra
Vortexer (G-560E)	Scientific Industries
Wasserbad (SUB6)	GRANT Instruments
Tischzentrifuge (5417C)	Eppendorf
Zellkulturzentrifuge (GS-6)	Bekman

### 2.2. Kits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
NucleoBond Finalizer-Kit	Marchery-Nagel
NucleoSpin®RNA II Kit	Marchery-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep	QIAGEN

### 2.3. Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad verwendet.

1kb DNA Ladder	New England BioLabs
100bp DNA Ladder	New England BioLabs
Adenine	Sigma
Agar-Bacteriological Grade MP	Biomedicals, INC

Ampicillin	Roche Molecular
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bovine Serum Albumine (BSA) 100x conc.	New England BioLabs
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O)	Sigma
Chloroform	Merck
Cholera Toxin aus <i>Vibrio cholerae</i>	Sigma, US Import
Collagenase D	Roche
Cycloheximide	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dispase I	Roche
Dithiothreitol (DTT)	GIBCO
DNase I	Roche
EDTA DNase I amplification grade	Invitrogen
EGF, recombinant human	Sigma
Ethanol (EtOH), 96%	J.T. Baker
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
GoTaq DNA Polymerase	Promega
HCL, rauchend	Merck
Hydrocortison	Merck
Insulin, from bovine pancreas	Sigma
Isopropanol	Sigma
L-165041	Calbiochem
LB-Broth (Luria/Miller)	Roth
Lithiumchlorid	Sigma
Mitomycin C, aus <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma
NEB Buffer 4	New England BioLabs
Oligo(dT) 12-18 Primer	Invitrogen
Orange G (Certistain <sup>®</sup> )	Merck
PCR reaction buffer 10x conc.	Roche
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	Sigma
Restriktionsenzyme (Xho 1 und Hpa 1)	New England BioLabs
RNaseA	Sigma
RNase OUT <sup>™</sup> Ribonuklease Inhibitor	Invitrogen
Seakem <sup>®</sup> LE Agarose	Cambrex
SuperScript <sup>™</sup> II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Invitrogen
TNFα, recombinant human	Strathmann Biotec AG
Trizol <sup>®</sup> -Reagent	GIBCO
Ultrapure dNTP Set	Amersham Biosciences

## 2.4. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
PBS Dulbecco´s	GIBCO
RPMI Medium 1640 (with GlutaMAX™ I)	GIBCO
DMEM low glucose (with GlutaMAX™ I, 1000 mg/L D-Glucose, without Sodium Pyruvate)	GIBCO
F-12 HAM-Medium	Sigma
Trypanblau	GIBCO
Trypsin-EDTA (1x) liquid, 100ml	GIBCO
1 % Penicilline/Streptomycine	GIBCO

### 2.4.1. Zusammensetzung verwendeter Nährmedien

Grundmedium	Zusätze (für 555 ml)	Verwendet für
<i>DMEM low glucose (with GlutaMAX™ I)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 333 ml DMEM low glucose</li> <li>• 167 ml F-12 HAM</li> <li>• 50 ml FCS</li> <li>• 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml)</li> <li>• 12,1 mg Adenin</li> <li>• Cholera-Toxin (Endkonzentration: 10 M)</li> <li>• Insulin, gelöst in 5 mM HCL (Endkonzentration: 5 µg/ml)</li> <li>• Hydrocortisone, gelöst in 100% EtOH (Endkonzentration: 0,5 µg/ml)</li> <li>• EGF, Endkonzentration:10 ng/ml</li> </ul>	Humane Keratinozyten
<i>DMEM low glucose (with GlutaMAX™ I)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 ml FCS</li> <li>• 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humane Fibroblasten</li> <li>• J2EP murine Fibroblasten</li> </ul>
<i>RPMI Medium 1640 (with GlutaMAX™ I)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 ml FCS</li> <li>• 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml)</li> </ul>	HeLa-Zellen
<i>RPMI Medium 1640 (with GlutaMAX™ I)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 ml FCS</li> <li>• 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml)</li> </ul>	293 FT-Zellen
<i>Gefriermedium</i>	für 100 ml: 10 ml DMSO 90 ml FCS	alle verwendeten Zellen

**Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien**



## 2.7. Bakterienstämme

STbl 2 (MAX Efficiency Competent Cells)

Invitrogen

## 2.8. Humane Zelllinien

293FT (ein Subtyp der HEK 293 Zelllinie)

Invitrogen

HeLa (humane epitheliale Karzinomzellen)

ATCC

## 2.9. Puffer und Lösungen

### Annealing Puffer (5x)

100mM Kaliumacetat

1.9 M Glycine

30mM HEPES, pH 7.4

230 mM Tris-HCl, pH 8.3

2mM Magnesiumacetat

2% SDS

### SDS-Elektrophoresepuffer 10x

1,9M Glycine

230mM Tris-HCL, pH 8,3

2% SDS

### Trenngelbuffer

1,5 M Tris, pH 8.8

### Sammelgelbuffer (4x)

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

### PCR reaction buffer (10x)

100 mM Tris-HCl

500 mM KCl, pH 8,3

BSA-Puffer für Restriktionsenzyme

20mM  $KPO_4$  (pH 7.0 at 25°C)

50mM NaCl

0.1mM EDTA

5% Glycerol

1x NEB Puffer 4

50mM Kaliumacetat

20mM Tris-acetat

10mM Magnesiumacetat

1mM Dithiothreitol, pH 7.9

2X HBS-Puffer

0.27M NaCl

10mM KCl

1,4mM  $Na_2HPO_4$

10mM D-Glucose

42mM HEPES

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

Die Etablierung primärer humaner Zellkulturen stellte einen wesentlichen Teil meiner Laborarbeit dar. Es konnten sowohl eine Feeder-Layer-Co-Kultur primärer humaner Keratinozyten als auch eine Einzel-Kultur primärer humaner Fibroblasten erfolgreich aufgebaut werden. Ausgangspunkt der primären Zellkulturen stellten Vollhautproben aus läsionaler und nicht läsionaler Haut psoriatischer Spender dar. Ferner wurden Kontrollkulturen aus klinisch gesunder Haut angelegt. Die Isolation von RNA und cDNA aus diesen primären Zellen stellte des Weiteren die Grundlage für spätere RT-PCR und Microarray-Studien dar.

##### **3.1.1. Primäre humane Keratinozytenkultur**

Die Kultur der primären Keratinozyten erfolgte in Form einer Feeder-Layer-Co-Kultur mit murinen J2EP-Fibroblasten. Analog zur Situation in vivo geben dabei die Fibroblasten Wachstumsfaktoren an die Keratinozyten ab und dienen den Keratinozyten als stabiles Gerüst zur Anlagerung und Koloniebildung.

###### *3.1.1.1 Isolation primärer humaner Keratinozyten aus Vollhautproben*

Unter sterilen Bedingungen wird einem Probanden je eine Stanzbiopsie von 4mm Durchmesser aus einer psoriatischen Plaque und aus benachbarter klinisch gesunder Haut entnommen. Die Hautproben werden in PBS-Medium aufgenommen und auf der sterilen Werkbank weiterverarbeitet. Das subkutane Fettgewebe sowie der angrenzende Anteil der Dermis werden mit dem Skalpell abgetrennt. Der nunmehr auf Epidermis und einen Rest von Dermis reduzierte Stanzzylinder wird in Dispase (gelöst in 2 ml PBS) aufgenommen und für 90min bei 37°C inkubiert. Die Konzentration der Dispase beträgt hierbei 0,5 mg/ml. Unter dem Einfluss des Enzyms erfolgt eine Ablösung der Hemidesmosomen entlang der epidermalen Basalmembran und somit eine Auftrennung der Hautprobe in Dermis und Epidermis. Nach vollendeter Inkubation wird die Epidermis vorsichtig mit einer Pinzette von der Dermis gelöst. Die Ablösung erfolgt im Idealfall als ganzes Stück. Nun wird die Epidermis mit dem Skalpell in möglichst kleine Teilstücke geschnitten. Diese werden in 5 ml Trypsin-EDTA aufgenommen und für circa 10 min bei 37°C inkubiert. Danach

erfolgt das vorsichtige Herauslösen der nunmehr lose im Zellgitter verankerten Keratinozyten, indem die Epidermisstücke mehrmals durch eine großlumige Pipette gezogen werden. Sobald makroskopisch keine Epidermisstückchen mehr sichtbar sind, erfolgt die Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 10ml des FCS-haltigen Keratinozytenmediums. Die Zellsuspension wird anschließend bei 1500rpm für 10min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wird abschließend in Nährmedium resuspendiert. Die Zellen werden gezählt und in der Anzahl von circa  $1 \times 10^5$  pro Wachstumsfläche auf mit einem Feeder-Layer aus Fibroblasten beschichteten 6-Well-Plates verteilt. Nach zwei Tagen beobachtet man eine erste Adhärenz der Zellen. Nach etwa fünf Tagen stellt sich eine erste Konfluenz der Zellen ein. Ein vorsichtiger Mediumwechsel sollte alle 2 bis 3 Tage erfolgen.

### *3.1.1.2 Herstellung der Feederlayer-Platten als Wachstumsgrundlage für humane Keratinozyten*

Adhärenz wachsende murine J2EP-Zellen werden in 75 cm<sup>2</sup> großen Wachstumsflaschen kultiviert und können bis zur zwanzigsten Passage als Feeder-Layer für Keratinozyten eingesetzt werden. Eine voll konfluente Kulturflasche kann auf sechs 58 cm<sup>2</sup> große Petrischalen für die Co-Kultur aufgeteilt werden. Optimal ist das Erreichen einer ca. 40%igen konfluenten Bedeckung der Wachstumsfläche. Die J2EP-Fibroblasten werden einen Tag vor ihrer Verwendung als Feeder-Layer mit dem Mitosegift Mitomycin C behandelt, um eine weitere Konfluenz und somit ein Überwachsen der Keratinozyten durch die Fibroblasten in der Co-Kultur zu verhindern. Dieses wird in einer Wirkkonzentration von 4 µg/ml direkt in das Nährmedium der Zellen pipettiert. Die Zellen werden nun für 2 bis 3 h mit dem Mitomycin C im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgen ein Spülvorgang mit erwärmtem PBS und die Ablösung der Zellen mittels Trypsin-EDTA-Inkubation für circa 5 min. Das Trypsin wird mittels FCS-haltigem Nährmedium inaktiviert und die entstandene Zellsuspension wird bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach 5 min in der Zentrifuge haben sich die J2EP-Zellen am Gefäßboden abgesetzt. Das Zellpellet wird in 6 ml Nährmedium resuspendiert. Es folgt die Aufteilung der Feeder-Layer-Zellen auf die Wachstumsflächen der Co-Kultur. Die Petrischalen werden mit circa 5 ml Nährmedium aufgefüllt und bei 37°C gelagert. Innerhalb einiger Stunden werden die J2EP-Zellen adhärenz und können als Feeder-Layer fungieren.

### *3.1.1.3 Passagieren der primären humanen Keratinozyten*

Um die Keratinozyten zu passagieren, müssen diese zunächst von den J2EP-Zellen abgelöst werden. Hierzu erfolgt nach einer vorsichtigen Spülung mit erwärmten PBS die Inkubation einer 58 cm<sup>2</sup> großen Petrischale mit 4 ml Trypsin-EDTA. Nach 5 min bei 37°C haben sich die Feeder-Layer-Zellen von der Wachstumsfläche gelöst, wohingegen die Keratinozytenkolonien der Wachstumsfläche noch fest anhaften. Mit der Pipette wird nun vorsichtig das Trypsin mit den J2EP-Zellen von der Platte abgenommen. Um möglichst alle Feeder-Layer-Zellen zu entfernen, erfolgt eine vorsichtige Spülung mit PBS. Die verbleibenden Keratinozytenkolonien werden nun mit 5 ml Trypsin-EDTA für circa 15 min bei 37°C inkubiert. Nach erfolgreicher Ablösung wird das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension wird für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Nährmedium resuspendiert und kann auf eine neue, maximal fünf Tage alte Feeder-Layer-Platte gesetzt werden. Die Umsetzung der Keratinozyten erfolgt im Verhältnis 1:3. Ab der zweiten Passage werden die Keratinozyten in 58 cm<sup>2</sup> großen Petrischalen, davor in 6-Well-Plates kultiviert. Die Wachstumstemperatur beträgt 37°C bei einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5-8%.

### *3.1.1.4 Einfrieren, Lagern und Auftauen der primären humanen Keratinozyten*

Das Einfrieren der Keratinozyten erfolgt nach deren Ablösung von den Feeder-Layer-Zellen. Es werden circa  $1 \times 10^6$  Keratinozyten in 1,5 ml Gefriermedium, welches zu 90% aus FCS und zu 10% aus DMSO besteht, aufgenommen. Die Zellen werden nun in einer Isopropanol-Box bei -80°C gelagert. Die Box ermöglicht dabei eine Abkühlung der Keratinozyten um circa 1°C pro h. Am Folgetag werden die Keratinozyten bei -140°C gelagert und können so für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgt durch eine rasche Erwärmung der Kryo-Lagerungsbehälter in der Hand. Sobald die Zellsuspension flüssig ist, erfolgt die Aufnahme in 15 ml 37°C warmes Keratinozyten-Medium. Die Zellen werden zentrifugiert und auf frische Feeder-Layer-Platten ausplattiert. Auch J2EP-Zellen können nach diesem Schema eingefroren und aufgetaut werden.

### **3.1.2. Primäre humane Fibroblastenkultur**

#### *3.1.2.1 Isolation primärer humaner Fibroblasten aus Vollhautproben*

In Lokalanästhesie wird einer Versuchsperson eine 4 mm große Hautstanze aus psoriatischer Haut entnommen. Die Probe wird in PBS aufgenommen und auf der sterilen Werkbank weiterverarbeitet. Das subkutane Fettgewebe wird mit dem Skalpell abgetrennt. Der obere Teil des Stanzzylinders mit Dermis und Epidermis wird mit dem Skalpell in möglichst kleine Teilstücke zerschnitten. Diese werden in 2 ml unverdünntem Trypsin-EDTA aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei sollte das Herauslösen der Fibroblasten aus dem Gewebegitter durch gelegentliches Schütteln unterstützt werden. Nach vollendeter Inkubation erfolgt die Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 min. Das Pellet aus Gewebeteilstücken und bereits freigesetzten Fibroblasten wird nun in 2 ml Tumorzersetzungsmittel, bestehend aus den Enzymen DNase und Collagenase, resuspendiert und für weitere 90 min bei 37°C inkubiert. Hierunter kommt es zu einer Zerstörung des Gewebenetzes und somit zum Herauslösen einzelner Fibroblasten aus den Gewebestücken. Schließlich wird der Ansatz mit 8 ml Fibroblastenmedium aufgefüllt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wird abgenommen und das Pellet erneut in Medium resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Aufnahme in 5 ml Nährmedium und die Aussaat in 50 cm<sup>2</sup> großen Kulturflaschen. Eine Adhärenz der Fibroblasten ist nach etwa zwei Tagen zu beobachten. Der erste Mediumwechsel zur Entfernung von Zelldetritus sollte nach zwei Tagen erfolgen. Zu einer ersten Konfluenz kommt es allerdings erst nach etwa einer Woche. Die adhärent wachsenden Fibroblasten benötigen stabile Wachstumsbedingungen mit einer Umgebungstemperatur von 37°C und 5-8% CO<sub>2</sub>-Anteil der Umgebungsluft.

#### *3.1.2.2 Passagieren primärer humaner Fibroblasten*

Die Fibroblasten werden zunächst für circa 10 min mit Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Um eine 50 cm<sup>2</sup> große Wachstumsfläche abzulösen, werden 1,0 ml Trypsin direkt auf die mit warmen PBS gespülten Zellen gegeben. Nach der Inkubation wird das Trypsin durch Zugabe von etwa 5 ml des FCS-haltigen Nährmediums inaktiviert. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frisches Nährmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 auf neue Wachstumsflächen gesetzt. Verwendet werden ab der zweiten Passage 75 cm<sup>2</sup> große Kulturflaschen.

### 3.1.2.3 Einfrieren, Lagern und Auftauen primärer humaner Fibroblasten

Das Einfrieren, Lagern und Auftauen primärer Fibroblasten erfolgt analog dem Vorgehen bei der Keratinozytenkultur.

## 3.2. Stimulationsversuche mit primären humanen Fibroblasten und Keratinozyten

Beide primären humanen Zelllinien wurden für Stimulationsversuche mittels proinflammatorischer Zytokine und Lithiumchlorid (LiCl) als Aktivator der Glycogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), und somit zur pharmakologischen Aktivierung des Wnt5a/ $\beta$ -Catenin Signalweges eingesetzt. Die anschließende Auswertung des Stimulationseffektes auf die Genexpression der primären Zellen erfolgte mittels RT-PCR.

### 3.2.1. Stimulation primärer humaner Fibroblasten

Am Vortag der Stimulation werden je  $3 \times 10^5$  primäre Fibroblasten in einem Well einer 6-Well-Platte ausplattiert. Nach etwa einem Tag sind die Fibroblasten adhärent und bedecken die Wachstumsfläche zu etwa 70%. Die Zellen werden nun einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Zytokin / Chemikalie stimuliert. Die Stimulationssubstanz wird direkt in das Nährmedium der Zellen gegeben. Anschließend erfolgt die Inkubation bei 37°C für 19 h. Die Effekte der Stimulation werden anschließend durch PCR-Studien untersucht. Die Aufbereitung des Zellmaterials schließt sich an den Stimulationsversuch an. Für die Stimulation von Fibroblasten wurden LiCl sowie das Zytokin TNF $\alpha$  verwendet.

Primäre Zellen	Zellen / Well	Gesamtvolumen	Zytokin/ Chemikalie	Stammkonzentration	Endkonzentration	Verdünnungsfaktor
Humane Fibroblasten	$3 \times 10^5$	2 ml	LiCl	4 M	30 mM	1:133
			TNF $\alpha$	60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20 ng/ml	1:2500

Tabelle 2: Stimulation primärer humaner Fibroblasten

### 3.2.2. Stimulation primärer humaner Keratinozyten

Die Stimulation primärer Keratinozyten erfolgt weitestgehend analog zu der Stimulation primärer Fibroblasten. Die Keratinozyten werden in 6-Well-Platten ausplattiert und am Folgetag mit der Stimulationssubstanz in Kontakt gebracht. Nach 24 h erfolgt die Weiterverarbeitung des Zellmaterials. Zur Stimulation primärer Keratinozyten wurden die Chemikalie LiCl sowie das Zytokin TNF $\alpha$  verwendet.

Primäre Zellen	Zellen / Well	Gesamt-volumen	Zytokin/ Chemikalie	Stammkonzentration	Endkonzentration	Verdünnungsfaktor
Humane Keratinozyten	$\geq 2 \times 10^5$	2 ml	LiCl	4 M	30 mM	1:133
			TNF $\alpha$	60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20 ng/ml	1:2500

Tabelle 3: Stimulation primärer humaner Keratinozyten

### 3.3. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) Studien

Die RT-PCR ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von spezifischer mRNA mittels Amplifikation. Da die meisten der verwendeten Polymerasen DNA-abhängig sind und RNA nicht amplifizieren können, teilt sich das Verfahren in zwei Arbeitsschritte. Zunächst wird die aus Zellen isolierte mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Darauf folgt eine normale PCR mit der Taq-DNA-Polymerase.

#### 3.3.1. Aufarbeitung des Zellmaterials für die PCR

Um die Genexpression in primären Zellen mittels RT-PCR zu untersuchen, ist es notwendig, zunächst die in diesen Zellen enthaltene mRNA, welche ein Abbild der Genexpression darstellt, mittels eines chemischen Verfahrens zu isolieren.

##### 3.3.1.1 Isolation von mRNA aus primären Zellen mit Trizol<sup>®</sup>-Reagent

Die primären Zellen werden unter Verwendung von Trypsin von der Wachstumsfläche gelöst und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das entstandene Zellpellet in 1 ml Trizol<sup>®</sup>-Reagent resuspendiert und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Trizol<sup>®</sup>-Reagent bewirkt hierbei eine Lyse der Zellmembran und eine Homogenisation der Suspension. Es folgt die Zugabe von

0,2 ml Chloroform. Das Reaktionsgefäß wird anschließend für 15 s kräftig manuell geschüttelt und für 2-3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch die folgende Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C für 15 min erfolgt eine Auftrennung des Reaktionsansatzes in eine obere wässrige sowie eine untere organische Phase. Die RNA befindet sich nunmehr ausschließlich in der oberen Phase. Diese wässrige Phase wird nun vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol durchmischt. Nach 15 min Inkubation bei RT erfolgt die erneute Zentrifugation. Nach dieser wird die RNA als gelartiges, durchscheinendes Pellet sichtbar. Der Überstand wird vollständig abpipettiert. Das RNA-Pellet wird durch Zugabe von 0,75 ml Ethanol (75%) und Zentrifugation bei 7.500 g und 4°C für 5 min gereinigt. Das Ethanol wird vorsichtig abgenommen und es folgt die Trocknung des RNA-Pellets durch Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Das Pellet wird abschließend in RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 min bei 55°C inkubiert. Die isolierte RNA kann anschließend bei -20°C gelagert werden. Die Konzentration der gewonnenen RNA-Lösung wird mittels Photometrie ermittelt. Eine verdünnte Probe der RNA wird in die Messkammer des Photometers eingesetzt und mit Strahlung der Wellenlänge 260 nm durchleuchtet. Die optische Dichte (OD) der RNA wird gemessen. Anhand folgender Formel kann die RNA-Konzentration berechnet werden:

$$\text{RNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{OD} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40) : 1000.$$

### 3.3.1.2 Synthese der cDNA-Matrix aus der isolierten RNA

Die Umschreibung der RNA in cDNA, welche dann mittels PCR ausgewertet werden kann, erfolgt mit Hilfe der Enzyme DNase und Reverse Transkriptase sowie eines RNase-Inhibitors. Das Enzym Desoxyribonuklease (DNase) wird der RNA-Probe zugesetzt, um diese von einer möglichen Kontamination durch Einzel- oder Doppelstrang-DNA zu befreien.

Stammlösungen	Konzentration	Finale Konzentration	n = 1
RNase Inhibitor	40 U/ $\mu\text{l}$	2, 00 U/ $\mu\text{l}$	1,5 $\mu\text{l}$
DNase I	1 U/ $\mu\text{l}$	0, 27 U/ $\mu\text{l}$	8,0 $\mu\text{l}$
DNase I Reaction Buffer	10x conc.	1x conc.	3,0 $\mu\text{l}$
RNA			2,0 $\mu\text{g}$
DEPC - H <sub>2</sub> O		auf 30,0 $\mu\text{l}$ auffüllen	

**Tabelle 4: Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese aus RNA I**

Der Reaktionsansatz wird für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl EDTA erfolgt die Inkubation bei 65°C für 10 min. Die gereinigte RNA kann bei -20°C gelagert werden.

### 3.3.1.3 Umschreibung der RNA in cDNA

In diesem Schritt erfolgt die Synthese der Einzelstrang-cDNA, wobei die RNA dem Enzym Reverse Transkriptase (SuperScript™II Reverse Transcriptase) als Matrix dient. Verwendet wurde eine M-MLV-RT ( Moloney-Murine-Leukemia-Virus-Reverse Transcriptase). Die Oligo(dT)-Primer hybridisieren sich dabei mit der RNA und dienen der Reversen Transkriptase als Startpunkt. Es erfolgt die Zugabe von dNTP als Oligonukleotidquelle sowie von DTT als Enzymstabilisator. Des Weiteren wird durch die Zugabe eines rekombinanten RNase-Inhibitors (RNaseOUT™) die RNA vor einer Zerstörung durch RNasen geschützt und somit die Gesamtmenge aus RNA gewonnener cDNA erhöht.

Die genannten Reagenzien werden dem DNase-Verdau streng in folgender Reihenfolge zugesetzt.

#### 1. Oligo(dT)-Primer

#### 2. dNTP-Mix

An dieser Stelle erfolgt die Inkubation des Reaktionsansatzes bei 65°C für 5 min, danach die sofortige Abkühlung auf Eis.

#### 3. RT-Puffer

#### 4. DTT

#### 5. RNase-Inhibitor

Die Hälfte des Reaktionsansatzes wird nunmehr in ein separates Reaktionsgefäß überführt und nicht mit reverser Transkriptase versetzt. Sie kann später als Kontrolle eine mögliche Kontamination des Ansatzes mit DNA auf einem Agarosegel sichtbar machen.

#### 6. Reverse Transkriptase

Der Reaktionsansatz wird für 50 min bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit ist die Reverse Transkriptase enzymatisch aktiv und es erfolgt die Umschreibung der RNA in Einzelstrang-cDNA. Anschließend wird die Reverse Transkriptase durch 15 min Inkubation bei 72°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA kann nun bei -20°C gelagert werden und als Matrix für eine PCR-Studie eingesetzt werden.

Reagenzien	Stammkonzentration	Volumen [ $\mu$ l]	Gesamtvolumen [ $\mu$ l]
RNA	0,5 – 1 $\mu$ g	10	20
Oligo(dT)-Primer	500 $\mu$ g/ml	1	
dNTP-Mix	10 mM	1	
5xRT-Puffer	5 x konzentriert	4	
DTT	0,1 M	2	
RNase-Inhibitor	2 U/ $\mu$ l	1	
SuperScript II Reverse Transcriptase	200 U/ $\mu$ l	1	

**Tabelle 5: Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese aus RNA II (1x Ansatz)**

Die hergestellte cDNA kann nun in einem herkömmlichen PCR-Verfahren als Matrize (Template) eingesetzt werden.

### 3.3.2. PCR-Reagenzien

Jedes gängige PCR-Verfahren beruht auf den folgenden Komponenten:

1. Eine Ausgangs-DNA, in der das zu amplifizierende Teilstück enthalten ist, das sogenannte Template.
2. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq Polymerase) zur Synthese der gewünschten DNA-Polynukleotidketten.
3. Oligonukleotid-Primer, welche komplementär zu der zu amplifizierenden cDNA sind. Primer lagern sich an das Template an und fungieren als Start- und Endpunkte für die Polymerase, welche Oligonukleotidketten verlängern kann, aber nicht zur de novo Synthese von DNA befähigt ist.
4. Ein dNTP-Gemisch als Desoxyribonukleotidquelle
5. Magnesiumionen fungieren als Cofaktor der Polymerase und unterstützen die Anlagerung der Primer an die cDNA.
6. Puffersubstanzen zur Erzeugung eines optimalen pH-Wertes

### 3.3.3. Ablauf der PCR

Die PCR basiert auf drei wesentlichen, hintereinander ablaufenden Teilreaktionen. Zunächst erfolgt die hitzevermittelte Auftrennung des DNA-Doppelstranges (dsDNA) in zwei komplementäre Einzelstränge (ssDNA). An diese Einzelstränge heften sich

zunehmend die spezifischen Primer an und markieren das gewünschte DNA-Teilstück. Dieses Teilstück wird anschließend durch die Taq Polymerase amplifiziert. Durch zyklische Wiederholung von Primeranheftung und Amplifikation erreicht die PCR eine millionenfache Anreicherung des gewünschten DNA-Teilstücks in der Probe. Die folgende Tabelle zeigt den genauen Ablauf einer PCR in einem Thermocycler.

Schritt	Reaktion	Erklärung
1	<i>Initiale Denaturierung</i>	Die dsDNA wird auf Temperaturen zwischen 94-96°C erhitzt. Hierbei kommt es zum Aufbruch von Wasserstoffbrückenbindungen und somit zur Auftrennung der dsDNA in ssDNA. Nur im ersten Zyklus wird die dsDNA länger erhitzt, um eine sichere Denaturierung sowohl des Templates als auch der Primer-DNA zu garantieren.
2	<i>Denaturierung</i>	
3	<i>Annealing</i>	Die Primer binden an die beiden ssDNA-Stränge. Die Temperatur wird hierbei auf Werte zwischen 50-65°C abgesenkt; sie muss für jedes Primerpaar individuell berechnet werden.
4	<i>Elongation</i>	Die Taq-Polymerase füllt nun die fehlenden Stränge in 3'-5'-Richtung mit Nukleotiden auf. Der Primer stellt den Anfangspunkt des zu amplifizierenden Genprodukts dar und wird nicht wieder abgelöst. Die Temperatur beträgt bei diesem Teilschritt zwischen 68-72°C. Sie ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Länge der Zielsequenz.
5	<i>Wiederholung</i>	Die Teilschritte 2-4 werden ca. 25-35 mal wiederholt. Dabei kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des durch die Primer markierten Teilstücks.
6	<i>Finale Elongation</i>	Die Polymerase beendet die enzymatische Tätigkeit.

Tabelle 6: Ablauf der PCR

### **3.3.4. Auswahl spezifischer Primer und Berechnung der Annealingtemperatur**

Primer markieren für die Taq-Polymerase den Beginn des zu amplifizierenden Teilstücks. Die als Primer ausgewählten Teilstücke des zu untersuchenden Gens markieren mit ihrem Abstand die Länge des amplifizierten Teilstückes. Es ist existentiell, dass ein für das bestimmte Gen spezifisches Teilstück als Primer ausgewählt wird. Diese Exklusivität des Primers wird mittels eines BLAST-Programmes kontrolliert.<sup>88</sup> Wäre dies nicht der Fall, würde sich der Primer an mehreren Teilen der Template-DNA anlagern und es wäre keine spezifische Amplifikation eines Genabschnittes möglich. Ferner sollten der Forward- und der Reverse-Primer nicht (auch nicht in einzelnen Basenpaaren) komplementär zueinander sein, da diese sonst einen Doppelstrang formieren und nicht an die Template-DNA anheften. Der Gehalt an G und C Nukleotiden in einem Primer sollte 55 % nicht überschreiten.

Die Annealingtemperatur (AT) eines Primerpaares beschreibt die Temperatur, bei welcher die Primer sich besonders gut an die Template cDNA anlagern können. Die Annealing Temperatur ist abhängig vom Gehalt der Primer an G und C Nukleotiden und wird nach folgender Formel berechnet:

$$AT = [(Anzahl C + Anzahl G) \times 4] + [(Anzahl A + Anzahl T) \times 2] - 5$$

Die berechnete Temperatur kann in einer Test-PCR überprüft und bei schlechter Amplifikationsleistung um einige Grad variiert werden.

### **3.3.5. PCR mit spezifischen Primern**

Für jedes der amplifizierten Genabschnitte wurden spezifische Primer entworfen und ein ideales PCR-Protokoll ausgearbeitet. Die folgende Tabelle zeigt die Reaktionsabläufe der durchgeführten PCR-Studien:

		<b>β-Actin</b>		<b>β- Catenin</b>		<b>GAPDH</b>		<b>PPARδ</b>		<b>WNT5a</b>	
		°C	min	°C	min	°C	min	°C	min	°C	min
<b>1</b>	<i>Initiale Denaturierung</i>	94	2:00	94	2:00	94	3:00	94	2:00	94	2:00
<b>2</b>	<i>Denaturierung</i>	94	0:30	94	0:30	92	0:20	94	0:30	94	0:30
<b>3</b>	<i>Annealing</i>	56	0:50	58	0:50	58	0:30	54	0:50	53	0:50
<b>4</b>	<i>Elongation</i>	72	1:00	72	0:50	72	1:00	72	0:50	72	1:00
<b>5</b>	<i>Wiederholung</i>	24 Zyklen		24 Zyklen		34 Zyklen		29 Zyklen		34 Zyklen	
<b>6</b>	<i>Finale Elongation</i>	72	7:00	72	7:00	72	5:00	72	7:00	72	7:00

**Tabelle 7: PCR-Protokolle mit spezifischen Primern**

Das Gesamtvolumen aller PCR-Reaktionsansätze betrug 25 µl. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung dieses Reaktionsansatzes.

<b>Stammlösungen</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Finale Konzentration</b>	<b>n = 1</b>
dNTP	25 mM	10 mM	0,25 µl
Primer	3 µM	300 nM	2,50 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	40 mU/µl	0,20 µl
PCR reaction buffer	10x conc.	1x conc.	2,50 µl
Template DNA	Variiert	Variiert	1,00 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O			18,55 µl

**Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes**

### 3.3.6. Auswertung mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient dem Nachweis der Amplifikate. Durch Erhitzen von Agarose und Elektrophoresepuffer (1x TBE) und anschließendes Gießen mit Hilfe eines Kammes und nachfolgendes Erkalten entsteht ein Gel mit Taschen. Kleine Mengen der PCR-Produkte werden auf ein 1 %-iges Agarosegel pipettiert. Da DNA-Lösungen und TBE eine ähnliche Dichte aufweisen, versetzt man die DNA-Proben mit Probenpuffer, welcher Ficoll enthält und somit die DNA in die Geltasche sinken lässt. Bis die Proben aus den Taschen gelaufen sind, wird eine Spannung von

60 V, später von 120 V, angelegt. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer Größe entsprechend kathodenwärts. Parallel lässt man als Größenmarker eine DNA-Leiter mitlaufen. Für Amplifikate, die kleiner als 3 kb sind, gilt, dass die Laufstrecke umgekehrt proportional dem Logarithmus der Fragmentlänge ist. Die Banden werden mit Ethidiumbromid (0,6 µg/ml), einem Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA interkaliert, und anschließender UV-Bestrahlung bei 220 nm sichtbar gemacht.

### **3.4. Klonierung eines si-RNA-tragenden lentiviralen Transfervektors (pLL 3.7 mit shRNA)**

#### **3.4.1. Austestung der shRNA-Sensesequenz durch das Lipofectamin-Protokoll**

Mit Hilfe des siDesignCenter der Herstellerfirma Dharmacon wurden für die Gene PPAR $\delta$  und  $\beta$ -Catenin spezifischen shRNA-Sequenzen entwickelt.<sup>89</sup>

Um die Effektivität des sog. „knock down“ der Ziel mRNA durch die ausgewählten Insertsequenzen zu verifizieren, wird diese vor dem Start aufwändiger Klonierungsarbeiten mittels des Lipofectamin-Protokolls getestet. Dabei werden HaCat-Keratinocyten als Testzellen eingesetzt und mittels der Substanz Lipofectamin mit einer kleinen Menge der zu testenden shRNA-Nukleotidkette transfiziert. Der Reaktionsansatz aus shRNA und Lipofectamin verbleibt für insgesamt vier Stunden auf den Keratinocyten. Anschließend werden diese in normalem RPMI 1640 Medium für weitere 30 h kultiviert. In dieser Zeit vollzieht sich die gewünschte Herunterregulation der spezifischen Genprodukte durch Bindung freier mRNA-Einheiten an die shRNA. Freie mRNA zur Translation in Protein steht nur noch in stark verminderter Form bereit. Das Versuchsergebnis wird im Anschluss mittels RT-PCR mit spezifischen Primern für das Zielgen sichtbar gemacht. Der detaillierte Versuchsablauf ist in Tabelle 9 dargestellt.

<i>Tag 1</i> Stunde 0	<b>Vorbereitung der HaCat-Keratinocyten</b>	5x10 <sup>4</sup> HaCat-Keratinocyten werden in jedem Well einer 6-Well-Platte ausplattiert und mit RPMI 1640-Medium ohne Antibiotikazusatz bedeckt.
<i>Tag 2</i> Stunde 16		Abnahme des Mediums vom Vortag und Waschung der Zellen mit PBS. Zugabe von 1,5 ml frischem Medium pro Well.
<i>Tag 2</i> Stunde 17,5	<b>Herstellung des shRNA-Lipofectamine 2000-Mix</b>	Zusammenpipettierung von 8 µl Lipofectamin 2000 und 250 µl Optimem unter vorsichtigem Mischen. Verbleib bei RT für 5 min. Zusammenpipettierung von 2,5 µl shRNA (Konz.: 100 pmol/µl) und 250 µl Optimem. Vereinigung der beiden Ansätze (Gesamtvolumen: 510,5 µl) in einem Reaktionsgefäß und Inkubation bei RT für 20 min.
<i>Tag 2</i> Stunde 18	<b>Transfektion</b>	Der Transfektionsansatz wird vorsichtig in das Medium der HaCat-Zellen geträufelt und durch Schwenken vermischt.
<i>Tag 2</i> Stunde 22	<b>Waschung</b>	Abnahme des Transfektionsansatzes von den Zellen und vorsichtige Waschung mit PBS. Versorgung mit normalem RPMI 1640-Medium.
<i>Tag 3</i> Stunde 48	<b>Zellernte</b>	Abnahme der Zellen von der Wachstumsplatte mittels Trizol und Aufarbeitung für die PCR.

**Tabelle 9: Ablauf der Testung von shRNA-Sensesequenzen mittels Lipofectamin**

Nach Darstellung der erfolgreichen Transkriptionshemmung durch die shRNA-Einheit werden die shRNA (Sensestrang) und ein komplementärer Antisensestrang bestellt.

### **3.4.2. Annealing des Sense- und Antisensestranges zum Doppelstrangoligo**

Im Folgenden werden Sense- und Antisensestrang im Thermocycler unter Zugabe eines Annealing-Puffers zu einer Doppelstrang-DNA vereint, da die Insertsequenz nur als Doppelstrang in den Vektor eingebaut werden kann. Dabei bleiben die für die Restriktionsendonukleasen Xho1 und Hpa1 spezifischen „Sticky Ends“ jedoch am 5`- und am 3`- Ende des Nukleotidstrangs als Einzelstrang-DNA bestehen, um später mit den komplementären „Sticky Ends“ des mittels der entsprechenden Restriktionsenzyme verdauten Vektorplasmids ligiert werden zu können.

Annealingprotokoll:

1. 2 µl Sensestrang + 2 µl Antisensestrang (Konzentration: 100 pmol/µl)
2. Zugabe von 48 µl Annealingpuffer
3. Inkubation im Thermocycler: 4 min bei 95°C gefolgt von 10 min bei 70°C
4. Abkühlung auf RT (Lagerung bei -20°C)

### **3.4.3. Verdau des Vektorplasmids**

Der 7650 Basenpaare (bp) große Trägervektor pLL3.7 wird mittels der Restriktionsenzyme Xho1 und Hpa1 an zwei Stellen „verdaut“. Innerhalb der Multi-Cloning-Side des Vektors befinden sich für diese Restriktionsenzyme spezifische Schnittstellen. Diese befinden sich für Xho1 bei 2950 bp und für Hpa1 2935 bp. Dabei besitzt der Vektor jeweils nur eine Schnittstelle pro verwendetem Restriktionsenzym. Durch diesen Verdau erhält der Vektor die für die enzymatische Einbringung der Insertsequenzen notwendigen „Sticky Ends“. Dies ist die notwendige Voraussetzung, um die shRNA-Oligos in das Trägerplasmid einbringen zu können.

Material	Menge [µl]	Ablauf
Xho1	1,5	Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C für 3h
Hpa1	1,5	
pLL 3.7 (Konzentration: 1,6 µg/µl)	3	
BSA (10x)	3	
NEB Buffer 4	3	
H <sub>2</sub> O	18	

**Tabelle 10: Reaktionsansatz des Vektorverbaus mit Restriktionsenzymen**

#### 3.4.4. Ligation von Vektorplasmid und shRNA-Insert

Nach erfolgreichem Vektorverbau kann die Insertsequenz mittels des Enzyms Ligase der Herstellerfirma Invitrogen und dem zugehörigem Reaktionspuffer in dieses eingebracht werden. Das Enzym verbindet dabei die „Sticky Ends“ von Insert und Trägerplasmid. Die zyklische Form des Plasmids wird dabei wieder hergestellt.

Material	Menge [µl]	Ablauf
shRNA-Oligo (Insert)	5	Inkubation bei 4°C Außentemperatur in einem Thermomixer bei 16°C für 16 h
pLL3.7 (verdautes Trägerplasmid)	2	
Ligase (Invitrogen)	1	
Ligase Reaction Buffer (Invitrogen)	2	
Destilliertes H <sub>2</sub> O	10	
Gesamtvolumen	20	

**Tabelle 11: Reaktionsansatz der Ligation von Vektorplasmid und shRNA-Insert**

#### 3.4.5. Aufreinigung des Plasmids mittels Gelextraktion

Nach der erfolgreichen Ligation von shRNA-Insertsequenz und Trägerplasmid ist die Klonierung auf enzymatischer Ebene abgeschlossen. In dem Reaktionsansatz der Ligation liegt nun das fertige Plasmid mit enthaltener Insertsequenz in geringer Konzentration vor. Um dieses mit Hilfe sogenannter kompetenter Zellen zu amplifizieren, ist es notwendig, das Plasmid vorher mittels Gelextraktion aus dem Ligationsansatz zu isolieren und von den Rückständen dieser zu reinigen. Dazu wird zunächst ein Agarosegel mit Hilfe eines Kammes gegossen. In eine Tasche des Gels

wird nun der gesamte, mit Ficoll versetzte, Ligationsansatz gegeben. Für die Elektrophorese wird eine Spannung von etwa 100 V angelegt. Unter der UV-Lampe kann das Plasmid im Anschluss sichtbar gemacht werden. Nun wird der gesamte DNA-tragende Anteil aus dem Agarosegel mit dem Skalpell herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende Herauslösung des Plasmids geschieht mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit. Dieses wird nach den Angaben des Herstellers angewendet.

### 3.4.6. Transformation in kompetente Stbl2-Zellen

Die Amplifikation der fertigen Plasmide wird durch kompetente Zellen geleistet. Diese vermehren bei ihrer eigenen Mitose das Plasmid automatisch mit. Die Einbringung des Plasmids in diese kompetenten Stbl2-Zellen des Herstellers Invitrogen erfolgt nach dessen Empfehlungen.

### 3.4.7. Wachstum der kompetenten Zellen auf Agarplatten

Stbl2-Zellen, in die das Trägerplasmid pLL3.7 erfolgreich eingebracht wurde, erhalten über dieses eine genetische Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin. So können sich nur die transformierten Zellen auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte vermehren. Dazu wird direkt nach der Transformation der gesamte Reaktionsansatz auf die Platte aufgebracht und über 24 bis 48 h bei 37°C inkubiert, so dass es zum Wachstum von plasmidhaltigen Zellkolonien kommt.

Material	Menge
LB-Pulver	12,5 g
Agar-Pulver	7,5 g
Destilliertes H <sub>2</sub> O	500 ml
Ampicillin	250 µl Endkonzentration: 50 µg/ml

**Tabelle 12: Ansatz zur Herstellung ampicillinhaltiger Agarplatten**

Zur Herstellung der ampicillinhaltigen Agarplatten werden die Reaktionsbestandteile in einer sterilisierten Glasflasche mit Schraubverschluss vermischt und für 1 Stunde maschinell autoklaviert. Im Wasserbad erfolgt die Abkühlung des Ansatzes auf 50°C

und die Zugabe des Antibiotikums. Das flüssige Agarosegel wird nun zu je 7,5 ml auf Petrischalen verteilt und über Nacht bei RT zum Aushärten belassen. Fertige Agarplatten werden bei 4°C gelagert.

### **3.4.8. Plasmidamplifikation und –isolierung**

Die auf den Agarplatten gewachsenen Einzelkolonien werden nach mindestens 24 h mittels eines sterilen Plastikstiftes zum Teil von der Platte abgehoben. Die Zellen werden nun in ein Kunststoffreaktionsgefäß gegeben und unter Zugabe von je 7 ml ampicillinhaltigem LB-Medium für circa 16 h in einem Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. So kommt es zu einer weiteren Vermehrung der plasmidhaltigen Zellen in dem Medium. Am Folgetag werden 6 ml der entstandenen Zellsuspension herunterzentrifugiert. Ein Milliliter wird bei 4°C zurückgestellt, um als Ausgangspunkt einer erneuten Plasmidamplifikation innerhalb von 48 h eingesetzt werden zu können. Aus dem nach der Zentrifugation resultierenden Zellpellet kann nun mit Hilfe des QIAprep Miniprep-Kits der Firma Qiagen das klonierte Plasmid herausgelöst werden. Die Ausführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

Ein nachfolgender Kontrollverdau des Plasmids mit den Restriktionsenzymen Xho1 und Hpa1 zeigt auf einem Agarosegel anschließend die erfolgreiche Einbringung des Inserts in den Trägervektor im Vergleich zum ursprünglichen Leervektor an. Nach erfolgreichem Kontrollverdau wird mittels des zurückgestellten Restes der plasmidhaltigen Zellsuspension erneut ein Amplifikationsansatz aus 500 ml ampicillinhaltigem LB-Mediums angesetzt. Es erfolgt die Inkubation im Thermoschüttler bei 37°C für etwa 24 h. Aus der erhaltenen Zellsuspension kann mittels des EndoFree Plasmid Purification-Kits (Maxiprep) von Qiagen analog zum Miniprep das Plasmid herausgelöst werden. Die Anwendung befolgt das Herstellerprotokoll.

Durch diese Plasmidisolierung erhält man circa 700 µl plasmidhaltiger wässriger Lösung. Die Konzentration der Plasmid-DNA in dieser Lösung wird mit der Hilfe eines optischen Dichtemessers bestimmt. Dieser bestimmt die optische Dichte (OD) mittels der Durchleuchtung einer 1:20-Verdünnung der Plasmidlösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Die Berechnung der Konzentration des Plasmids in µg/µl erfolgt nach folgender Formel:

$OD_{A260nm} \times 50$  (Multiplikationsfaktor für dsDNA)  $\times 20$  (Verdünnungsfaktor)

---

1000

Durch Division der OD bei 260nm durch die OD bei 280nm erhält man eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen dsDNA, den sogenannten Reinheitsfaktor (RF). Angestrebt wird ein RF von mindestens 1,8.

### **3.4.9. Plasmidsequenzierung**

Nach erfolgter Klonierung wurden die Insertsequenz des Plasmids und ein kleiner Bereich beidseits dieser mit Hilfe spezifischer Primer sequenziert. So können die basenpaargenaue Intaktheit und Lage des Inserts kontrolliert werden.

## **3.5. Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren zur stabilen Transfektion primärer humaner Keratinozyten**

### **3.5.1. Virusproduktion**

Die Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren erfolgte zu deren Nutzung als Vektoren zur Einbringung der shRNA-tragenden Plasmide in primäre Keratinozyten. Angewendet wurde dabei ein Verfahren von Trono et al.<sup>85</sup> zur Herstellung hochtitriger Lentiviren unter der Verwendung von Vektoren des Verpackungssystems der dritten Generation.<sup>84</sup> Die folgende Tabelle zeigt das verwendete Protokoll zur Virusproduktion:

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>Ablauf</b>
<b>Tag 1</b> <i>Stunde 0</i>	<b>Zellen:</b> 293 FT-Zellen FT-Zell-Medium	2,5 x 10 <sup>6</sup> 293 FT-Zellen werden auf Petrischalen ausplattiert (Wachstumsfläche: 58 cm <sup>2</sup> ) und mit 6 ml FT-Zell-Medium versorgt
<b>Tag 2</b> <i>Stunde 16</i>	<b>Plasmide:</b> Transferplasmid Verpackungsplasmide <b>Chemikalien:</b> HEPES H <sub>2</sub> O 2xHBS-Puffer CaCl <sub>2</sub>	<b>1. Herstellung des Transfektionsansatzes:</b> 20 µg pLL3.7 (mit bCat-shRNA) Transferplasmid 15 µg pMDLg/p RRE Verpackungsplasmid 5 µg pRSV-Rev Verpackungsplasmid 5 µg pMD2G Verpackungsplasmid HEPES H <sub>2</sub> O ad 500µl <b>2. Zugabe von 500µl 2 x HBS</b> <b>3. Zugabe von 50µl 2,5 mM CaCl<sub>2</sub></b> (langsam und tropfenweise auf dem Schüttelmixer) <b>4. Inkubation des fertigen Transfektionsansatzes bei RT für exakt 25 min</b>
<b>Tag 2</b> <i>Stunde 24,5</i>	Transfektionsansatz	Tropfweise Aufbringung des Transfektionsansatzes auf die 293FT-Zellen, danach Vermischung durch vorsichtiges Schwenken der Platte.
<b>Tag 2</b> <i>Stunde 24,5</i>		Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz für 7 h bei 37°C
<b>Tag 2</b> <i>Stunde 31,5</i>	FT-Zell-Medium	Vorsichtige Abnahme des alten Mediums von den Zellen und Gabe von 7 ml frischem FT-Zell-Medium
Inkubation der Zellen für 48 Stunden bei 5% CO <sub>2</sub> und 37°C; Produktion der Viruspartikel durch die Zellen		
<b>Tag 4</b> <i>Stunde 79,5</i>		Abnahme des virushaltigen Zellüberstandes.. Zentrifugation 4°C, 800 g, 5 min (Entfernung des Zelldebris). Filtration des Überstandes durch 0,45 µm-Filter. Lagerung bei -80°C.

**Tabelle 13: Protokoll zur Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren mittels 293-FT-Zellen**

### 3.5.2. Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des erzielten Virustiters werden HeLa-Zellen mit dem Virusüberstand transfiziert. Anhand der Transfektionsrate, welche mittels Durchflusszytometrie bestimmt wird, kann rechnerisch auf den Virustiter rückgeschlossen werden.

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>Ablauf</b>
<b>Tag 1</b> <i>Stunde 0</i>	-HeLa-Zellen -HeLa-Medium	Ausplattierung von je $8 \times 10^4$ HeLa-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte. Gabe von 2ml HeLa-Medium pro Well. Inkubation bei 37°C und 5% CO <sub>2</sub>
<b>Tag 2</b> <i>Stunde 24</i>	-Virusüberstand, verdünnt mit HeLa-Medium - Polybrene	Transfektion der Zellen durch Gabe von 2 ml frischem HeLa-Medium mit Zusatz von Virusüberstand (Verdünnungsfaktor: 1:100 ; 1:1000). Zugabe von Polybrene (Endkonzentration 8 µg/ml). Inkubation bei 37°C und 5% CO <sub>2</sub>
<b>Tag 4</b> <i>Stunde 96</i>	-Trypsin -PBS -FACS-Puffer	Spülen der HeLa-Zellen mit PBS und Ablösung mittels Trypsininkubation für 5 min. Inaktivierung des Trypsins und Zentrifugation der Zellsuspension bei 1500 rpm für 5 min. Resuspension des Zellpellets in FACS-Puffer.
<p>Ermittlung der Transfektionsrate (prozentualer Anteil der GFP exprimierenden Zellen) mittels FACS und der Cell-Quest pro Software.</p> <p>Bestimmung des Virustiters durch folgende Rechenoperation:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anzahl infizierter Zellen = Transfektionsrate x Zellzahl/100</li> <li>2. Virustiter = infizierte Zellen x Verdünnungsfaktor</li> </ol>		

**Tabelle 14: Transfektion von HeLa-Zellen zur Bestimmung des Virustiters**

### 3.6. Transfektion primärer humaner Keratinozyten (Protokolloptimierung)

Zwei Protokolle zur Einbringung der Viren in die primären Keratinozyten wurden verglichen. Das Standardprotokoll ist an etablierte Protokolle zur Transfektion von HeLa- und HaCat-Zellen angelehnt. Das Zentrifugationsprotokoll (siehe Tabelle 15)

stellt eine durch unsere Arbeitsgruppe neu etablierte Variante publizierter Protokolle zur Transfektion primärer Keratinozyten dar.

Schritt	Standardprotokoll		Zentrifugationsprotokoll	
	MOI 3	MOI 10	MOI 3	MOI 10
1	Tag 1: Ausplattieren von $3,6 \times 10^5$ Keratinozyten auf einer 6-Well-Platte.		Tag 1: Überführung von $3,6 \times 10^5$ Keratinozyten in Nährmedium in ein Zentrifugationsröhrchen	
2	Tag 2: Zugabe von $1,8 \times 10^6$ Viruspartikeln und Polybrene ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) in das Nährmedium	Tag 2: Zugabe von $3,6 \times 10^6$ Viruspartikeln und Polybrene ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) in das Nährmedium	Tag 1: Zugabe von $1,8 \times 10^6$ Viruspartikeln und Polybrene ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) in das Zentrifugationsröhrchen	Tag 1: Zugabe von $3,6 \times 10^6$ Viruspartikeln und Polybrene ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) in das Zentrifugationsröhrchen
3	Inkubation des Transfektionsansatzes bei $37^\circ\text{C}$ für 6 h		Zentrifugation für 45 min bei $37^\circ\text{C}$ bei 1500 rpm	Zentrifugation für 45 min bei $37^\circ\text{C}$ bei 1500 rpm
4	Tag 4: Ablösung der Zellen von der Wachstumsfläche mittels Trypsin		Resuspension der Zellen in dem Transfektionsansatz und Ausplattierung der Keratinozyten auf einer 6-Well-Platte. Der Transfektionsansatz verbleibt dabei auf den Zellen	
5	Tag 4: Auswertung mittels FACS		Tag 2: Mediumwechsel	
6			Tag 4: Auswertung mittels FACS	

**Tabelle 15: Ablauf der Transfektion primärer humaner Keratinozyten. Standardprotokoll vs. Zentrifugationsprotokoll**

### 3.7. Microarrayversuche

#### 3.7.1. Stimulation primärer humaner Keratinozyten mit L-165041

Primäre humane Keratinozyten aus gesunder Spenderhaut werden mit dem PPAR $\delta$ -Agonist L-165041 in DMSO (0,1%ige Lösung) versetzt. DMSO wird auch dem nicht stimulierten Kontrollansatz als Vehikelkontrolle zugefügt.

Die Stimulation erfolgt nach dem in Tabelle 16 dargestelltem Protokoll.

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>Durchführung</b>
<b>Tag 1</b> <i>Stunde 0</i>	Primäre Keratinocyten Keratinocytenmedium	Ausplattierung von jeweils $5 \times 10^5$ Zellen in Petrischalen (Wachstumsfläche: $58 \text{ cm}^2$ ) und Zugabe von 6 ml Keratinocytenmedium. Inkubation bei $37^\circ\text{C}$ und 5% $\text{CO}_2$ .
<b>Tag 2</b> <i>Stunde 24</i>	PBS L-165041 DMSO	Waschung der Keratinocyten mit PBS. Zugabe des Stimulationsansatzes auf die Zellen. Dieser enthält L-165041 in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ . Die Kontrollzellen werden nur mit dem Trägerstoff DMSO versetzt. Die Endkonzentration von DMSO beträgt in beiden Ansätzen 0.05%. Inkubation bei $37^\circ\text{C}$ bei 5% $\text{CO}_2$ .
<b>Tag 3</b> <i>Stunde 48</i>		Wiederholung der Stimulation identisch zum Vortag. Erneute Inkubation für 24 h.
<b>Tag 4</b> <i>Stunde 72</i>	RA1-Puffer Flüssiger Stickstoff	Waschung des Zellrasens mit PBS. Lyse der Zellen und Überführung des gesamten Zellmaterials in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mittels wiederholter forcierter Spülung mit $350 \mu\text{l}$ RA1-Puffer (Merchery-Nagel). Schockfrieren des Zelllysats durch Eintauchen des Reaktionsgefäßes in flüssigen Stickstoff
Lagerung bei $-70^\circ\text{C}$ bis zur RNA-Isolierung		

**Tabelle 16: Ablauf der Stimulation von primären humanen Keratinocyten mittels L-165041**

### **3.7.2. Isolation von RNA primärer humaner Keratinocyten für den Microarray**

Die Isolierung der mRNA aus dem Zelllysate erfolgte durch protokollgetreue Anwendung des Nucleo Spin RNA II-Kits der Firma Marchery und Nagel.

### **3.7.3. Auswertung des Microarrays zur Detektion von PPAR $\delta$ -Zielgenen**

Es folgte der Versand von jeweils 5  $\mu$ g reiner (RF >1,7) mRNA an die Firma Memorec (Köln, Deutschland) zur Durchführung des Microarrays (Hybridisierung und Fluoreszenzmarkierung). Angewendet wurde der Hybridisierungschip PIQUOR SkinPatho (Human Antisense).

Als Zielgene von PPAR $\delta$  wurden Gene mit einer mindestens zwei Standardabweichungen stärkeren bzw. schwächeren Fluoreszenz in den mit L-165041 stimulierten Proben angesehen.

## 4. Ergebnisse

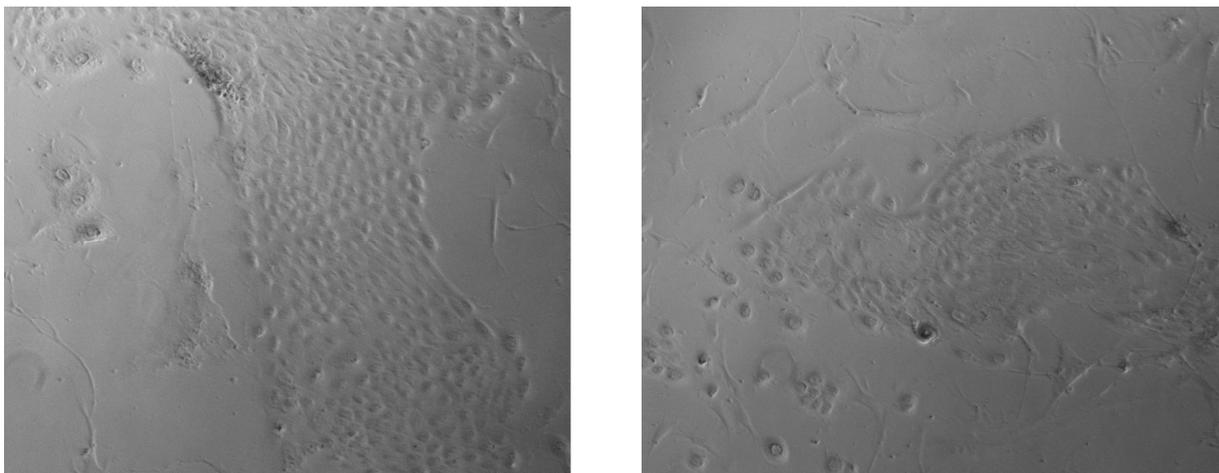
### 4.1. Erfolgreiche Etablierung der Keratinozytenkultur

Das wesentliche Ziel meiner wissenschaftlichen Arbeit lag in der Erforschung des genetischen Expressionsprofils psoriatischer Keratinozyten. Der Neuaufbau einer Primärkultur adulter Fibroblasten und Keratinozyten aus läsionaler und nicht läsionaler Haut von Psoriasispatienten stellte somit den Grundpfeiler meiner Versuche dar.

Als Feeder-Layer setzte ich zunächst – gemäß der Standardmethode – murine 3T3-Fibroblasten (J2EP Linie) ein, welche nach einer Mitomycin C Behandlung (4 µg/ml) teilungsunfähig geworden waren. Damit ließ sich zunächst die erwartete gute Kultivierbarkeit der Keratinozyten aufzeigen.<sup>90</sup> Jedoch beobachtete ich eine schnelle Degeneration der für die Feeder-Layer Produktion auf Vorrat kultivierten 3T3-Zellen. Nach nur etwa 20 Passagen waren diese nicht mehr erfolgreich als Feeder-Layer zu verwenden. Es erfolgte eine verminderte Anheftung von primären Keratinozyten an den Feeder-Layer. Auch kam es trotz rigider Einhaltung des Protokolls zu einer mit jeder Passage anwachsenden Kontamination der Keratinozyten mit degenerierten Feeder-Layer Zellen, da die selektive Ablösung der Fibroblasten in der ersten Phase der Trypsinbehandlung mit zunehmendem Alter der Zellen immer weniger gelang. Die degenerierten Feeder-Layer Zellen störten Anheftung und Proliferation der Keratinozyten erheblich und führten somit zu einer auf ca. vier Passagen verminderten Kulturzeit der Keratinozyten. Diese verfrühte Degeneration der Keratinozyten erschwerte deren quantitativ ausreichende Anzucht erheblich und machte die Suche nach anderen, den murinen 3T3 Fibroblasten überlegenen Feeder-Layer Zellen notwendig.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass aus Lungengewebe isolierte humane Fibroblasten (MRC-5 Klon) murinen Fibroblasten als Feeder-Layer für Keratinozyten gleichwertig sind.<sup>91</sup> Basierend auf diesem Ergebnis und auf der Überlegung, dass der Einsatz eines humanen Feeder-Layers den aktuellen Bemühungen um Xenobiotika freie Zellkulturen<sup>92</sup> Rechnung trägt, setzte ich versuchsweise humane Fibroblasten mit mammären Ursprung als Feeder-Layer Zellen ein. Unter Beibehaltung gleichartiger Kulturbedingungen wie für die murinen Fibroblasten und unter gleicher Behandlung mit Mitomycin C zeigten sich die humanen den murinen Fibroblasten deutlich überlegen. Diese konnten problemlos bis zu 50 Mal passagiert werden, ohne

verfrüht Degenerationsmerkmale im Sinne des Hayflick-Phänomens aufzuweisen. Auch die primären Keratinozyten wuchsen auf dem humanen Feeder-Layer schneller, wurden schneller adhärent und formten regelmäßige Kolonien als auf dem murinen Feeder-Layer. Auch gelang es wesentlich besser, die primären Keratinozyten ohne Kontamination durch Feeder-Layer Zellen zu passagieren. Primäre Keratinozyten konnten so quantitativ ausreichend angezüchtet und bis zu ca. 10 Passagen kultiviert werden. Damit ist der Einsatz humaner Fibroblasten als Feeder-Layer dem Einsatz von murinen 3T3-Fibroblasten vorzuziehen und übertrifft, was die Passagierbarkeit der Keratinozyten betrifft, die Standardmethode nach Rheinwald. Mit dem Einsatz humaner Fibroblasten als Feeder-Layer ist es gelungen, eine verlässliche Methode zur Kultivierung primärer psoriatischer Keratinozyten aus adulter Spenderhaut und aus gesunder Kontrollhaut adulter Spender in unserem Labor zu etablieren. Die quantitativ befriedigende Anzucht von Keratinozyten mit psoriatischem Phänotyp auf 3T3-Fibroblasten wurde bereits vor ca. zwanzig Jahren beschrieben.<sup>93</sup> Die hier angewendete Methode ersetzt den murinen Feeder-Layer durch humanes Material und verfügt durch diese Verringerung des xenobiotischen Materialanteils über einen wesentlichen Vorteil gegenüber der Standardmethode. Abbildung 4 zeigt eine lichtmikroskopische Darstellung einer Keratinozytenkolonie (2. Passage) auf humanen Fibroblasten als Feeder-Layer.



**Abbildung 4: Humane Keratinozyten aus läsionaler psoriatischer Haut**

Lichtmikroskopische Darstellung (x 20) der Zellkultur mit humanen Fibroblasten als Feeder-Layer-Zellen. Dargestellt sind zwei einheitlich geformte, gleichförmige und nicht vorschnell ausdifferenzierte Keratinozytenkolonien.

## 4.2. RT-PCR-Studien

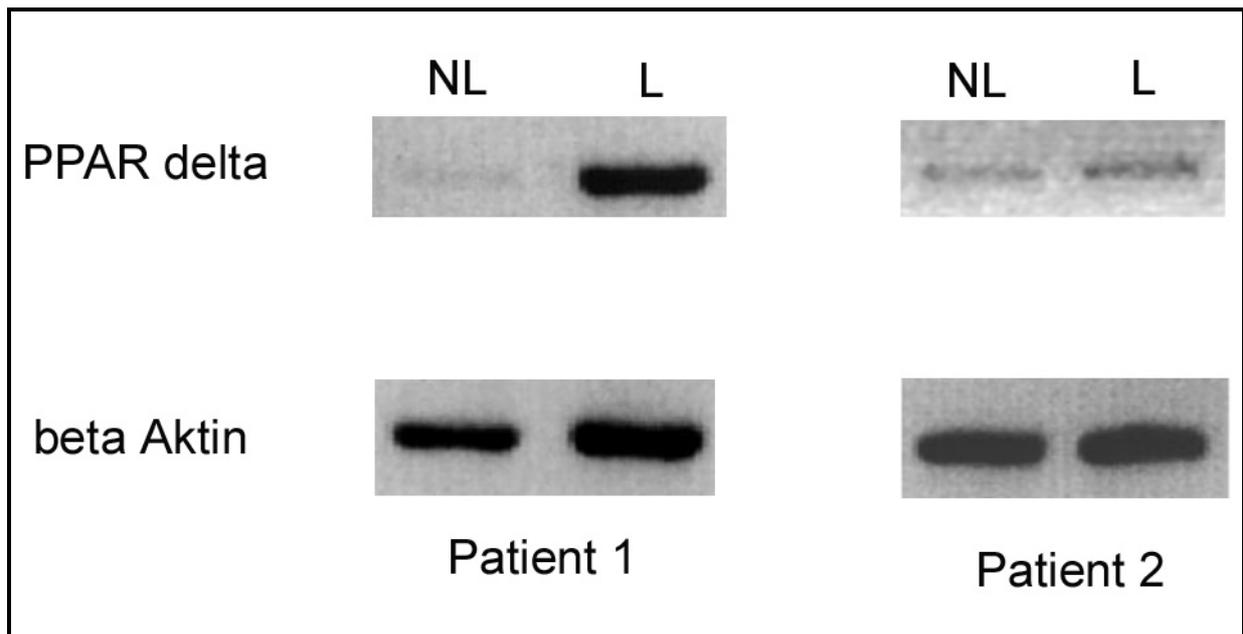
### 4.2.1. Ergebnisse der PCR-Studien an primären Fibroblasten aus läsionaler vs. nicht läsionaler Haut von Psoriasispatienten

In vorangegangenen Microarray Analysen konnte durch meine Arbeitsgruppe die gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors PPAR und des Gens WNT5a<sup>17</sup> in psoriatischer Haut gezeigt werden. Eine gesteigerte Expression von PPAR $\delta$  in murinen, einem Proliferationsstimulus ausgesetzten Keratinozyten konnte bereits nachgewiesen werden<sup>38</sup> und zahlreiche Publikationen weisen auf die zentrale Rolle von PPAR $\delta$  in der Entstehung von Hyperproliferation, entzündlicher Infiltration und gestörter Zelldifferenzierung bei der Psoriasis hin.<sup>23</sup> Die Expression von PPAR $\delta$  in primären psoriatischen Zellen wurde allerdings bisher nicht ausreichend untersucht. Da die bei Psoriatikern regelhaft beobachtbaren entzündlichen Veränderungen in Dermis und Epidermis anerkannter Maßen einen starken Proliferationsreiz auf Fibroblasten darstellen, untersuchte ich die basale Expressionsrate von PPAR bei diesem Zelltyp.

Um die basale Expression von PPAR $\delta$  in humanen Fibroblasten mit psoriatischem Phänotyp nachzuweisen bzw. zu quantifizieren, wurden RT-PCR-Untersuchungen an diesen Zellen und an gesunder Kontrollhaut durchgeführt. Dabei wurde die basale Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  in nicht läsionalen Fibroblasten psoriatischer Spender und in läsionalen Fibroblasten psoriatischer Spender verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die basale Transkription von PPAR $\delta$  in läsionalen Fibroblasten (siehe Abbildung 5) gegenüber der basalen Transkription in nicht läsionalen Fibroblasten erhöht ist.

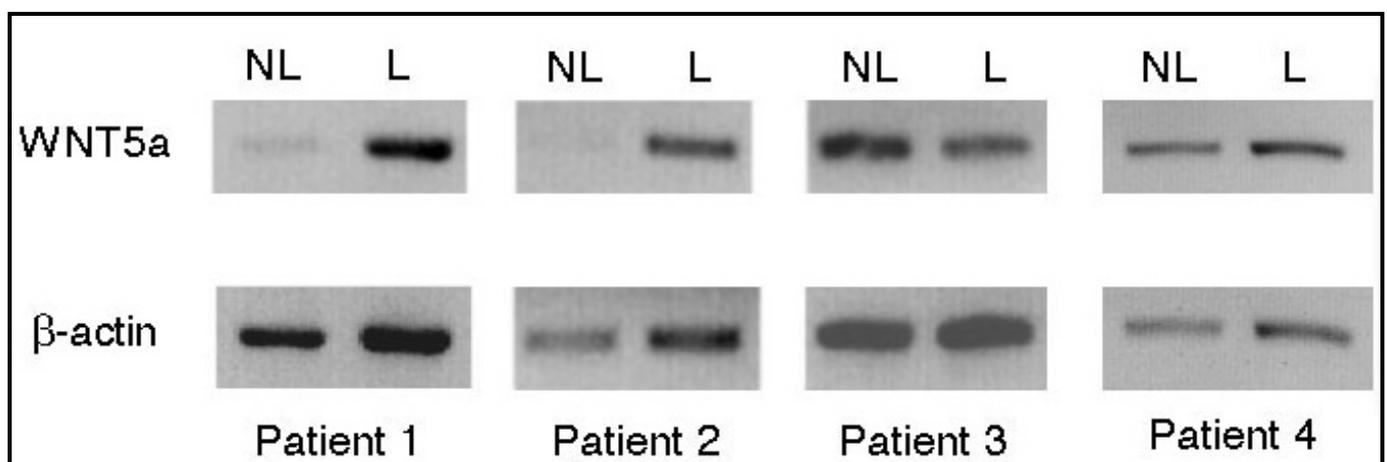
Auch das Gen WNT5a, von welchem eine gesteigerte Expression in psoriatischen Zellen durch Microarray Analysen in unserem Labor nachgewiesen werden konnte, wurde in RT-PCR-Studien an Fibroblasten untersucht. Hierbei zeigte sich eine gegenüber nicht läsionalen Zellen erhöhte basale Transkriptionsrate von WNT 5a (siehe Abbildung 6) in läsionalen Fibroblasten in drei von vier der untersuchten Proben

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass bei Fibroblasten aus läsionaler psoriatischer Haut eine gegenüber nicht läsionaler Haut gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  und des Gens WNT5a auftritt, und dass diese Überexpression zu der in vorangegangenen Microarray-Analysen beobachteten Hochregulierung dieser Gene in psoriatischer Haut beiträgt.



**Abbildung 5: Expression von PPAR $\delta$  in läSIONalen und nicht-läSIONalen Fibroblasten**

Dargestellt ist die Expression gemessen mittels RT-PCR in Duplikatbestimmung. Die  $\beta$ -Actin Kontrolle in den unteren Tafeln dient zur Verifizierung gleicher Mengen an RNA. Es zeigt sich eine erhöhte Expression von PPAR $\delta$  in läSIONalen Fibroblasten von zwei Spendern gegenüber nicht-läSIONalen Fibroblasten gleicher Spender. (NL = nicht-läSIONal, L = läSIONal).



**Abbildung 6: Expression von WNT5a in läSIONalen und nicht-läSIONalen Fibroblasten**

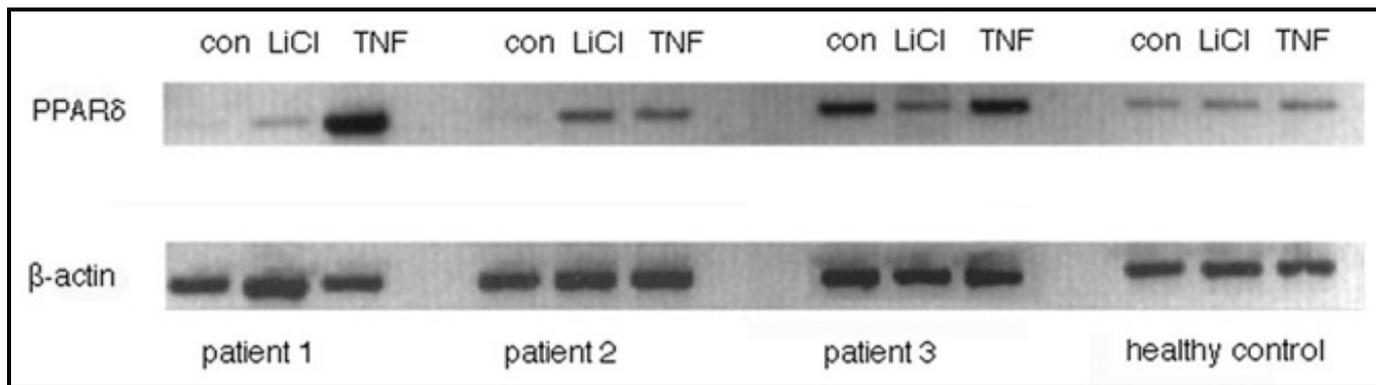
Dargestellt ist die Expression gemessen mittels RT-PCR in Duplikatbestimmung. Die  $\beta$ -Actin Kontrolle in den unteren Tafeln dient zur Verifizierung gleicher Mengen an RNA. Es zeigt sich eine erhöhte Expression von WNT5a in läSIONalen Fibroblasten von drei Spendern gegenüber nicht-läSIONalen Fibroblasten gleicher Spender. Im Falle von Patient 3 konnte keine gesteigerte Expression von WNT5a in läSIONalen Fibroblasten gezeigt werden (NL = nicht-läSIONal, L = läSIONal).

#### **4.2.2. Stimulationsversuche an primären nicht läSIONalen Fibroblasten aus psoriatischer Haut**

Um die Induzierbarkeit der mRNA-Expression von PPAR $\delta$  und WNT5a zu untersuchen, wurden nicht läSIONale primäre Fibroblasten mit zwei bekannten psoriasisverstärkenden Substanzen stimuliert. Lithiumchlorid (LiCl) ist ein aus der Klinik bekannter häufiger Auslöser von Erstmanifestationen oder Verschlechterungen der Psoriasis.<sup>94</sup> Des Weiteren aktiviert Lithium den  $\beta$ -Catenin Signalweg, was in murinen Kolon-Zellen zur Aktivierung von PPAR $\delta$  führt.<sup>95</sup> Auch der bekannte Entzündungsmediator TNF $\alpha$  wurde zur Stimulation der primären Zellen eingesetzt, da dieser ein Schlüsselzytokin in der Pathogenese der Psoriasis ist und aus der Literatur bekannt ist, dass TNF $\alpha$  PPAR $\delta$  in Mauskeratinozyten und in HaCat-Keratinozyten induzieren kann.<sup>17,41,96</sup> Die primären Zellen wurden mit LiCl in einer Konzentration von 30 mM und TNF $\alpha$  in einer Konzentration von 20 ng/ml für insgesamt 18 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Die zytosolische RNA wurde isoliert und für die PCR in cDNA umgeschrieben. Die Effekte der Stimulation auf die Expression von WNT5a und PPAR $\delta$  konnten daraufhin mittels RT-PCR untersucht werden.

In der RT-PCR zeigte sich für die nicht läSIONalen primären Fibroblasten in zwei von drei untersuchten Probanden eine deutliche Induzierbarkeit von PPAR $\delta$  durch Lithium (siehe Abbildung 7). Auch TNF $\alpha$  konnte in zwei Fällen eine Expressionsverstärkung von PPAR $\delta$  hervorrufen. In Kontrollfibroblasten eines gesunden Spenders konnte hingegen keine Verstärkung der Expression von PPAR $\delta$  durch die Stimulation gezeigt werden.

Die bekannten Psoriasisaggravatoren Lithium und TNF $\alpha$  führen zu einer Expressionsverstärkung von PPAR $\delta$  in nicht läSIONalen primären Fibroblasten. Dies bestätigt die in Mauskeratinozyten und HaCat-Keratinozyten schon publizierten Ergebnisse und legt nahe, dass die Induktion von PPAR $\delta$  in Fibroblasten von Psoriasispatienten ein zell-autonomer Phänotyp ist und auch in Zellkultur nachweisbar ist.



**Abbildung 7: Stimulation primärer nicht läsionaler Fibroblasten mit LiCl und TNF $\alpha$**

Dargestellt ist die Expression, gemessen mittels RT-PCR in Duplikatbestimmung. Die  $\beta$ -Actin Kontrolle in den unteren Tafeln dient zur Verifizierung gleicher Mengen an RNA.

Die bekannten Psoriasisaggravatoren Lithium und TNF $\alpha$  führen zu einer Expressionsverstärkung von PPAR $\delta$  in nicht läsionalen primären Fibroblasten (Patient 1 und Patient 2). Im Falle von Patient 3 konnte keine Induktion durch LiCl und TNF $\alpha$  nachgewiesen werden. Hier fällt jedoch bereits eine sehr prominente Kontrollbande auf.

### 4.3. Lentivirale Transfektion

#### 4.3.1. Etablierung des Zentrifugationsverfahrens

In unserem Labor wurde eine praktikable Methode zur hochtitrigen Produktion lentiviraler Vektoren etabliert<sup>86</sup> und erfolgreich zur Herstellung transgener HaCat-Keratinocyten-Stämme eingesetzt. Zur Vektorherstellung werden hierbei die von Trono et al. beschriebenen Vektor- und Verpackungsplasmide eingesetzt.<sup>85</sup> Als Ausgangsvektor wurde der Lentivektor pLL3.7 verwendet.

Im Rahmen der Gentransduktion mittels viraler Vektoren bietet die Einbringung von genspezifischen shRNA-Sequenzen in die viralen Vektoren ein qualitativ hochwertiges Verfahren zur Untersuchung der komplexen Genregulation in den Zielzellen. Da ich im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeiten über Zelllinien primärer psoriatischer Keratinocyten und Fibroblasten verfügte, lag es nahe, auch diese, den psoriatischen Phänotyp weitaus besser als die tumorgenerierten HaCat-Keratinocyten repräsentierende Zellen Gentransduktionsexperimenten mittels lentiviraler Transfektion zu unterziehen. Zu diesem Zweck wurde ein replikationsdefizienter lentiviraler Vektor mit spezifischer shRNA-Untereinheit für das Gen  $\beta$ -Catenin hergestellt. Die Auswirkungen eines verminderten  $\beta$ -Catenin-Gehaltes können dann - beispielsweise mittels RT-PCR-Studien – untersucht werden. Dabei ist ein Effekt auf die Genexpression ab einer Transfektionsrate von 60% der eingesetzten Zellen nachweisbar.

Da virale Vektoren bevorzugt mitotische Zellen infizieren, ist deren Anwendung zur Einbringung von Genmaterial in primäre humane Keratinozyten, die in vitro eine niedrige basale Teilungsrate aufweisen, beschränkt.<sup>77</sup> Die besten Ergebnisse berichten über Transfektionsraten von 90% erfolgreich virusinfizierten Zellen einer Versuchsreihe und wurden mit lentiviralen Systemen erzielt.<sup>78,97</sup> Hierbei wurden als Zielzellen allerdings die mitotisch sehr aktiven neonatalen Vorhautkeratinozyten eingesetzt. Die geschilderten Techniken beruhen im Wesentlichen auf der Zugabe von virushaltigen Suspensionen in das normale Keratinozyten-Medium. Die Substanz Polybrene kann mittels kleinster elektrischer Kräfte das Eindringen der Viruspartikel in die Zellen erleichtern und wurde in den Standardprotokollen dem Keratinozyten-Medium in einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugegeben.<sup>78</sup> Variable Aussagen werden über die Anzahl der Viren, die für die Infektion einer Zelle notwendig sind, gemacht. Dieses Verhältnis der infektiösen Viruspartikel zu den Zellen wird durch den sogenannten MOI-Wert (Multiplicity of Infection) beschrieben. Das Standardprotokoll setzt zur erfolgreichen Transfektion eines Keratinozyten 25 Viruspartikel ein (MOI 25).<sup>77</sup> Mittels dieser Verfahren werden Transfektionsraten von bis zu 90% der mit dem Virus über das Medium in Kontakt gebrachten Keratinozyten erzielt.<sup>78</sup> Die Bestimmung der Transfektionsrate erfolgt mittels FACS-Analysen. Hierbei wird das vektorgebundene GFP (Green fluorescent Protein) spezifisch in den transfizierten Zellen nachgewiesen, da diese sich in ihrem Fluoreszenzmuster durch die Einbringung von GFP von nicht transfizierten Zellen unterscheiden.

Die erfolgreiche Übertragung der bekannten Protokolle auf primäre humane Keratinozyten erschien aufgrund der niedrigeren mitotischen Aktivität der psoriatischen Keratinozyten unwahrscheinlich. Ich suchte nach einem Verfahren zur erfolgreichen Transfektion möglichst vieler primärer humaner Keratinozyten unter Verwendung der mir zur Verfügung stehenden, eher niedrigtitrigen Virussuspensionen.

Es wurden zunächst beide Transfektionsprotokolle mit einer MOI von 3 (d.h. 3 infektiöse lentivirale Partikel pro Zelle) und von 10 durchgeführt. Die Bestimmung der erzielten Transfektionsraten erfolgte mittels FACS-Analysen (siehe Tabelle 17). Die erfolgreiche Herunterregulierung der zytosolischen Konzentration an  $\beta$ -Catenin-mRNA wurde mittels RT-PCR gezeigt. Als interne Kontrolle wurden in der FACS-Auswertung nicht transfizierte Keratinozyten der gleichen Zellpopulation und in

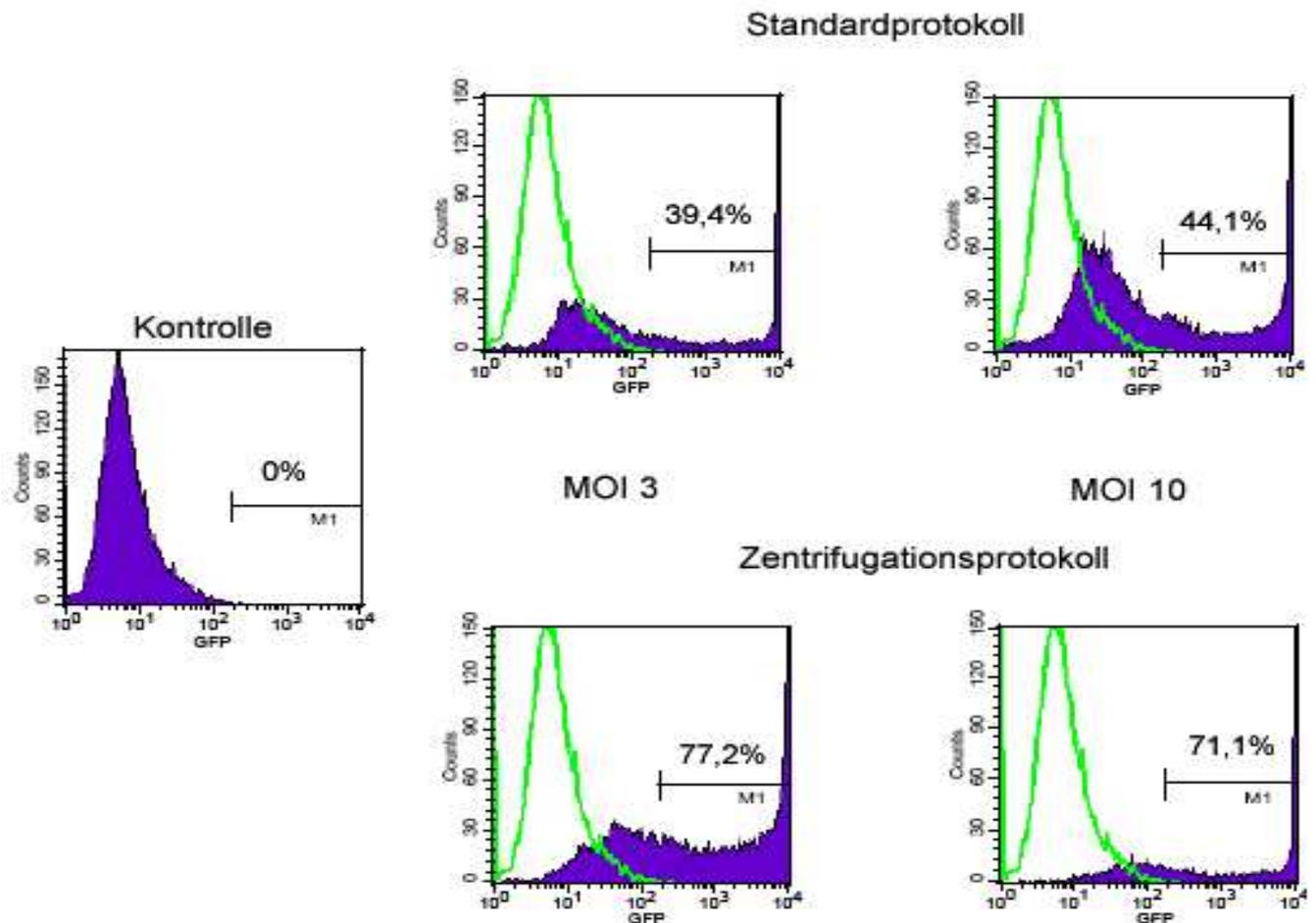
der RT-PCR mit einer shRNA freien Variante des pLL3.7-Vektors transfizierte Keratinozyten verwendet.

	<b>Standardprotokoll</b>		<b>Zentrifugationsprotokoll</b>	
<b>Transfektionsrate</b>	MOI3	MOI 10	MOI 3	MOI 10
<b>in %</b>	39,4	44,1	77,2	71,1

**Tabelle 17: Auswertung der Transfektionsraten primärer humaner Keratinozyten mittels FACS**

Dargestellt sind die Transfektionsraten der primären humanen Keratinozyten mittels des Standardprotokolls und des Zentrifugationsprotokolls. Das Zentrifugationsprotokoll führt zu einer deutlich höheren Transfektionsrate, wobei bei einer MOI von 10 gegenüber einer MOI von 3 keine weitere Steigerung der Transfektionsrate zu erzielen ist.

Die durch GFP verursachte Rechtsverschiebung des Fluoreszenzspektrums der primären Keratinozyten mit zunehmender Transfektionsrate konnte dabei sehr gut in der FACS-Auswertung gezeigt werden (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: FACS-Analyse der Transfektionsversuche**

Es lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

SP: Standardprotokoll

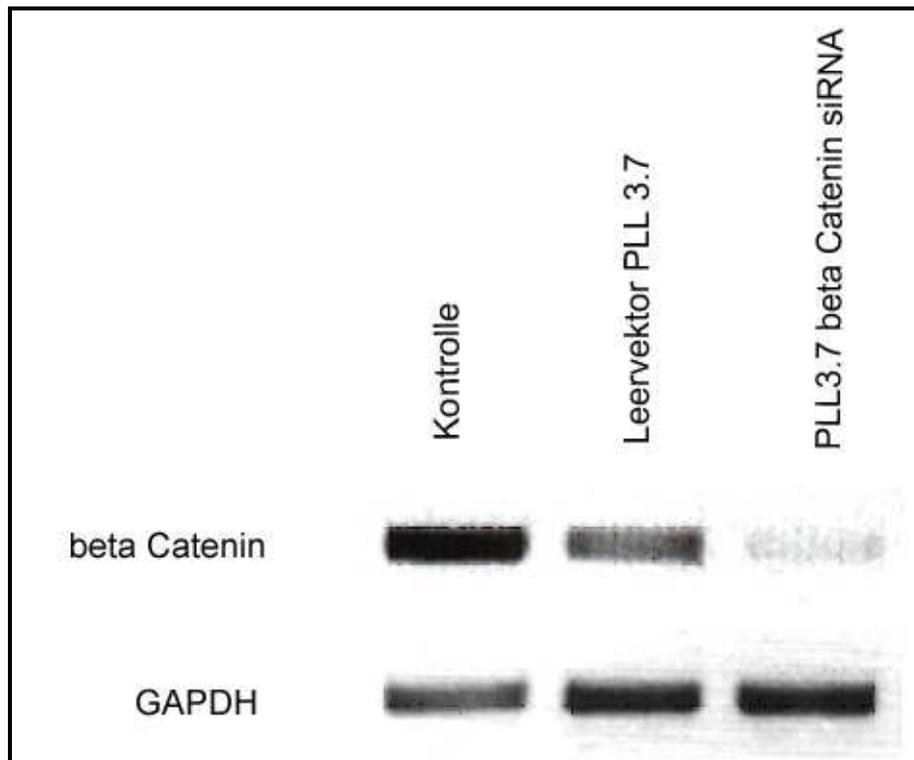
ZP: Zentrifugationsprotokoll

1. Das ZP ist dem SP zur Infektion primärer humaner Keratinozyten überlegen (77,2% bei MOI 3 ZP vs. 39,4% bei MOI 3 SP).
2. Trotz Erhöhung der MOI bleibt das SP dem ZP unterlegen (44,1% bei MOI 10 SP vs. 77,2% bei MOI 3 ZP).
3. Bei Anwendung des SP erfolgt ein Zuwachs der Infektionsraten bei steigender MOI (39,4% bei MOI 3 SP vs. 44,1% bei MOI 10 SP).
4. Bei Anwendung des ZP erfolgt kein Zuwachs der Infektionsraten bei steigender MOI (77,2% bei MOI 3 ZP vs. 71,1% bei MOI 10 ZP).

#### 4.3.2. Nachweis der erfolgreichen down-Regulation von $\beta$ -Catenin durch shRNA

Um die stabile Integration des vektorgekoppelten siRNA-Konstruktes in das Genom der Keratinozyten und dessen Expression in den Zellen zu belegen, führte ich eine

RT-PCR mit spezifischen Primern für das  $\beta$ -Catenin-Gen durch. Die erwartete Herunterregulation des  $\beta$ -Catenin-Gens ließ sich hierbei im Vergleich zu nicht infizierten Zellen der gleichen Population und mit einem Leervektor infizierten Zellen eindeutig nachweisen (siehe Abbildung 9). Mittels des hier etablierten Zentrifugationsprotokolls lässt sich somit eine erfolgreiche Gentransduktion in primäre humane Keratinozyten mittels lentiviraler Vektoren erreichen.



**Abbildung 9: Herunterregulation von  $\beta$ -Catenin in primären psoriatischen Keratinozyten durch lentivirale Transfektion**

Dargestellt ist die Expression gemessen mittels RT-PCR in Duplikatbestimmung. Die GAPDH-Kontrolle in den unteren Tafeln dient zur Verifizierung gleicher Mengen an RNA. Zu erkennen ist die durch den shRNA-tragenden Vektor vermittelte spezifische Herunterregulation der Expression des  $\beta$ -Catenin-Gens in primären humanen Keratinozyten. Eine Transfektion der gleichen Zellen mit einem Leervirus ohne spezifische siRNA führt nicht zu einer signifikanten Expressionsminderung.

#### **4.4. Micro-Array-Studien (PIQUOR SkinPatho microarray)**

##### **4.4.1. Ergebnisse interner Vorarbeiten und der Literaturrecherche**

In Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe wurden psoriasispezifische Veränderungen des genetischen Expressionsprofils mittels einer Microarray-Analyse untersucht.<sup>17</sup> Der verwendete Microarray-Chip Affymetrix U95A ist vergleichbar mit dem bei Zhou et al, 2003 verwendeten Chip Affymetrix U95A-E.<sup>48</sup> Hierbei wurden läsionale und

nicht läsionale Vollhautproben psoriatischer Haut mit läsionalen und nicht läsionalen Vollhautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis und Kontaktallergie auf den Expressionsstatus derselben Gene hin untersucht. Dieses Vorgehen erlaubt es, psoriasispezifische Gene zu detektieren und diese von Genen, die auch bei anderen entzündlichen Dermatosen in ihrem Expressionsprofil verändert sind, zu unterscheiden. Eine derartige Differenzierung wurde in den oben erwähnten Studien, beispielsweise von Zhou et al. 2003,<sup>48</sup> nicht vorgenommen. Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten 80% der bei Zhou et al. vorbeschriebenen Genexpressionsveränderungen bestätigen.

Die detektierten psoriasispezifischen Gene wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt, wobei die Mehrzahl mit der Fettsäuresignalkaskade oder mit dendritischen Zellen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Weitere verstärkt exprimierte Gene entstammten den Bereichen Adipogenese, Fettsäuretransfer, paroxysmal-oxidative Reaktion und Schweißregulation. Die bedeutenden regulativen Funktionen von PPAR $\delta$  in diesen Teilbereichen sind bekannt. PPAR $\delta$  selbst zeigte eine signifikante, zehnfach verstärkte Expression in den läsionalen psoriatischen Hautproben. Die überaus große Fraktion psoriasispezifischer PPAR $\delta$ -assoziiierter, transkriptionell dysregulierter Gene in psoriatischer läsionaler Haut macht eine pathophysiologisch bedeutende Aktivierung von PPAR $\delta$  wahrscheinlich.<sup>17</sup>

#### **4.4.2. PIQUOR SkinPatho Microarray**

Um weitere Erkenntnisse über die Signalkaskade der PPAR $\delta$ -induzierten Proliferationssteigerung in Keratinozyten zu gewinnen, führte ich eine weitere Microarray-Analyse durch. Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin, Zielgene von PPAR $\delta$  zu identifizieren, um so die funktionelle Bedeutung der psoriasispezifischen Aktivität von PPAR $\delta$  besser charakterisieren zu können.

Primäre humane Keratinozyten von zwei hautgesunden Spendern wurden für dieses Experiment mit dem PPAR $\delta$ -Liganden L-165041 stimuliert. In HaCat-Zellen und in nicht psoriatischen primären Keratinozyten konnten Veränderungen des Proliferationsindex nach Stimulation mit L-165041 bzw. nach PPAR $\delta$ -Knock-down beobachtet werden, weshalb diese Zellen zur Untersuchung PPAR $\delta$  induzierter Veränderungen des genetischen Expressionsprofils geeignet sind.

Die primären humanen Keratinozyten von zwei Spendern wurden entsprechend der Angaben in Material und Methoden mittels Zugabe von L-165041 in einer Endkonzentration von 1µM stimuliert. Nach 24h wurde das Medium in den zwei L-165041-Proben und den zwei DMSO-Kontrollen gewechselt und die Stimulationssubstanzen erneut hinzugegeben. Insgesamt wurden die Zellen für 48 h stimuliert. Die Isolation der zellulären RNA erfolgte mittels des Nucleo Spin II RNA Extraction Kit (Marchery-Nagel). Jeweils 5 µg isolierter RNA aus jeder Probe wurden für den Microarray-Versuch eingesetzt. Die RNA wurde mit dem PIQUOR SkinPatho Microarray (Memorec) hybridisiert. Dieser Chip enthält circa 1100 Gene, deren Relevanz für epidermalbiologische Vorgänge gesichert ist.

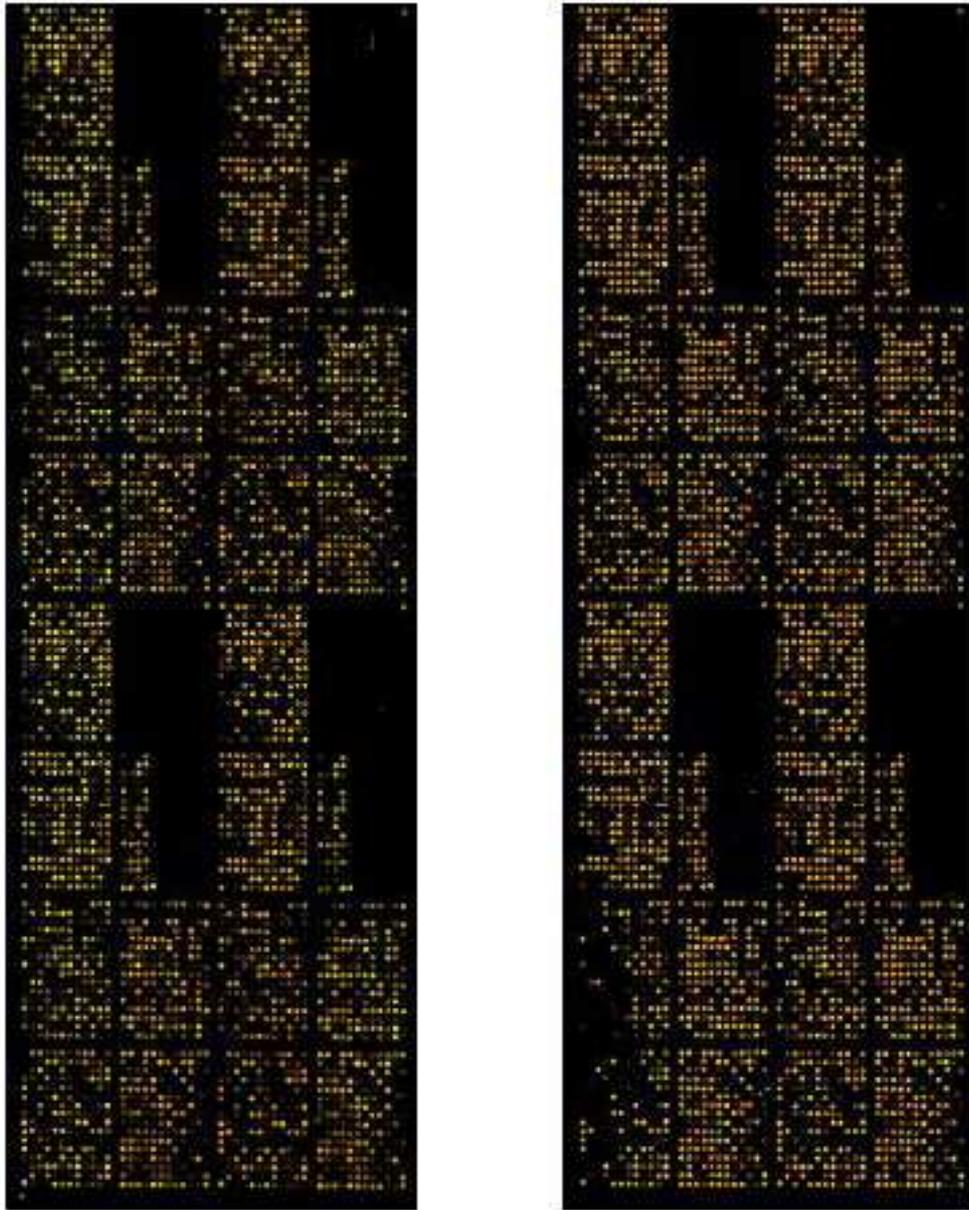
Nach der Durchführung einer Qualitätskontrolle der RNA mittels Elektrophorese erfolgte die Auswertung der Proben mittels dem PIQUOR SkinPatho Microarray. Jede der vier Proben wurde dabei einzeln auf die Antisense-Platte des Microarrays hybridisiert. Nachfolgend wurden jeweils die mit dem Liganden L-165041 stimulierte Probe eines Spenders und die zugehörige DMSO-Kontrolle des gleichen Spenders mittels „Übereinanderlegen“ der Arrays verglichen (siehe Tabelle 18). Dabei werden die zu vergleichenden Proben mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Den beiden DMSO-Kontrollen wurde dabei das fluoreszierende Cyanine 3 (Cy3) zugeteilt. Cy3 emittiert grünes Licht (Wellenlänge ~ 570 nm). Den beiden mit L-165041 stimulierten Proben wurde das fluoreszierende Cyanine 5 (Cy5) zugeteilt (Wellenlänge ~ 670 nm). Cy5 emittiert rotes Licht.

Spender	Stimulation mit L165041	DMSO-Kontrolle	Verwendeter Microarray	Vergleich	
A	Spender A L-165041 Cy5-1 Ligand		PIQUOR SkinPatho Microarray	Vergleich A	
		Spender A DMSO-Kontrolle Cy3-1 DMSO			
B	Spender B L-165041 Cy5-2 Ligand			PIQUOR SkinPatho Microarray	Vergleich B
		Spender B DMSO- Kontrolle Cy3-2 DMSO			

Tabelle 18: Probenanordnung zur Auswertung des PIQUOR SkinPatho Microarray

Nachfolgend werden die beiden unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben gemischt und auf das Trägermaterial hybridisiert.

Der mit den Proben bestückte Microarray wird nachfolgend in einem sogenannten Microarray-Scanner ausgewertet. Die unterschiedliche Fluoreszenz wird dabei mittels Laserstrahlen einer definierten Wellenlänge sichtbar gemacht. Die relative Intensität der Fluoreszenz kann nachfolgend in ein Verhältnis gesetzt werden und so eine Hoch- bzw. Herunterregulation von Genen anzeigen. Abbildung 10 zeigt das Fluoreszenzprofil der beiden Vergleichspaare im Überblick.



**Abbildung 10: Hybridisierungsschema des PIQUOR SkinPatho Microarrays. Vergleich A (links) und Vergleich B (rechts).**

Dargestellt ist der farbkodierte Vergleich der Expressionsstärke der untersuchten Gene auf den „übereinandergelegten“ Microarrays.

Das linke Hybridisierungsschema zeigt die Auswertung der beiden Proben des Spenders A. Das rechte Hybridisierungsschema zeigt die Auswertung der beiden Proben des Spenders B.

Rote Färbung bedeutet dabei, dass die Signalintensität und damit auch die Genexpression in der ligandenaktivierten RNA-Probe stärker ist. Grüne Färbung bedeutet hingegen, dass die entsprechenden Gene in der DMSO-Kontroll-Probe stärker exprimiert sind. Gelbe Färbung zeigt eine gleichstarke Genexpression an.

Die schwarzen Stellen auf dem Microarray zeigen artefaktüberlagerte (z.B. Luftblasen) Bereiche an. Da jedes untersuchte Gen auf dem Array insgesamt vier Mal vorhanden ist, entsteht durch diese Artefaktüberlagerungen kein relevanter Verlust an Untersuchungsergebnissen.

#### 4.4.2.1 Zielgene von PPAR $\delta$ im PIQUOR SkinPatho Microarray

Der von mir vorgenommene Microarray zeigt das genetische Expressionsprofil humaner Keratinozyten unter gezielter ligandenvermittelter Aktivierung von PPAR $\delta$  auf und ist somit besonders geeignet, die besondere Bedeutung der Dysregulation des Fettsäuremetabolismus für die Pathogenese der Psoriasis darzustellen. Zahlreiche Gene zeigten in den mit L-165041 stimulierten Proben eine gegenüber der Kontrolle veränderte Expression.

Um Zielgene des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  zu identifizieren, suchte ich nach Genen, deren Induktion bzw. Inhibition mindestens zwei Standardabweichungen größer als die durchschnittlichen Expressionsschwankungen gegenüber den Kontrollproben war. In zuvor durchgeführten Microarray-Studien<sup>98</sup> lag die mittlere Induzierbarkeit der untersuchten Gene im Bereich des Faktors 1,5 bis 3. Obwohl ein solches Vorgehen die Sensitivität des Microarrays schwächt, indem es Gene, die durch PPAR $\delta$  eventuell nur in einem geringen Maße reguliert werden, ausblendet, schützt es gleichzeitig vor der Einbeziehung möglicherweise falsch-positiver Gene. Die Spezifität des Microarrays wird demnach durch dieses Vorgehen erhöht.

Tabelle 19 zeigt die durch Anwendung der oben genannten Filterkriterien als Zielgene von PPAR $\delta$  identifizierten Gene.

Gen ID	NAME	Faktor <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	Faktor in vivo (U95A) <sup>3</sup>
ABCC3	multispecific organic anion transporter 2	1.8 $\pm$ 0.1	< 0.001	<b>2.4</b>
ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase	2.8 $\pm$ 0.4	< 0.001	n.s.
AKR1B1	Aldose reductase	1.9 $\pm$ 0.2	< 0.001	n.s.
CAT	Catalase Gen	2.5 $\pm$ 0.9	0.008	n.s.
<b>HB-EGF</b>	<b>heparing-binding EGF-like growth factor</b>	<b>1.9 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.009</b>	<b>3.6</b>
KRT75	cytokeratin type II (K6HF)	1.9 $\pm$ 0.5	< 0.001	n.s.
OACT5	O-acyltransferase domain containing 5	2.0 $\pm$ 0.1	0.002	n.s.

**Tabelle 19: Durch PPAR $\delta$ -Aktivierung induzierte Gene in primären humanen Keratinozyten**

<sup>1</sup> Mittlere Abweichung und Standardabweichung ( $\pm$ ) der Geninduktion im PIQUOR SkinPatho Microarray (L-165041 vs. 0,1% DMSO)

<sup>2</sup> Berechnet mittels zweiseitigem gepaartem t-Test (n.s. = nicht signifikant, p > 0,05)

<sup>3</sup> Hochregulation der Genexpression in läsionaler vs. nicht läsionaler Haut in vivo.<sup>17</sup> Untersucht mittels Affymetrix U95A Microarray.

Mehrere der aufgelisteten Gene konnten bereits in anderen Studien als Zielgene von PPAR $\delta$  identifiziert werden <sup>41,99</sup> und entstammen der funktionellen Gruppe der Fettsäuresignalkaskade, darunter bspw. das Acetyl-CoA-Dehydrogenase-Gen. Die Induzierbarkeit fettstoffwechselassoziierter Gene durch PPAR $\delta$  in humanen Keratinozyten konnte durch meine Expressionsanalyse bestätigt werden und bestätigt die Ergebnisse von Studien an anderen Zellarten sowie die internen Voruntersuchungen meiner Arbeitsgruppe. Ein gestörter, über die Norm erhöhter, durch PPAR $\delta$  induzierter Fettstoffwechsel kann nunmehr als reproduzierbarer Bestandteil der Psoriasispathogenese angesehen werden.

#### *4.4.2.1.1 HB-EGF ist ein Zielgen von PPAR $\delta$*

Neben den fettstoffwechselassozierten Genen konnte ich ein weiteres Gen als PPAR $\delta$ -induziert klassifizieren. Der Wachstumsfaktor HB-EGF zeigte im PIQUOR SkinPatho Microarray eine etwa um den Faktor 2 vermehrte Expression in den mit dem PPAR $\delta$ -Liganden stimulierten Proben. Damit erfüllt HB-EGF die oben genannten Filterkriterien und kann als Zielgen von PPAR $\delta$  angesehen werden. In Übereinstimmung dazu konnte mittels des durch unsere Arbeitsgruppe zuvor durchgeführten Microarrays U95A eine 3,6-fache Hochregulation von HB-EGF in läsionaler psoriatischer Haut gezeigt werden.<sup>17</sup>

Dieser Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor PPAR $\delta$  und dem Wachstumsfaktor HB-EGF stellt ein wichtiges, in der Literatur bisher nicht vorbeschriebenes Ergebnis dar. HB-EGF ist ein Mitglied der EGF-Familie, dessen fokale Überexpression in psoriatischen Plaques bereits beschrieben wurde.<sup>100</sup> Es ist bekannt, dass HB-EGF an den epidermalen Rezeptor ErbB1 bindet und eine wichtige Funktion für die autokrine Stimulation von humanen Keratinozyten innehat.<sup>101,102</sup> Hierbei wirkt HB-EGF als proliferationsförderndes Mitogen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Feeder-Layer-Co-Kultur mit humanen Fibroblasten als Feeder-Layer

Die heutzutage gängigen und weltweit in Gebrauch befindlichen zuverlässigen Protokolle zur Kultivierung humaner Keratinozyten basieren auf der 1975 publizierten Methode nach Rheinwald und Green. Diese Protokolle verwenden regelmäßig murine Fibroblasten – beispielsweise die J2 3T3-Zelllinie – als Feeder-Zellen für die Keratinozyten. Diese Form der Co-Kultivierung humaner und muriner Zellen ermöglicht bis heute die Anzucht von humanen Keratinozyten in großer Anzahl und stellt einen Meilenstein in der Methodik der Keratinozytenkultur und damit auch in der Erforschung der keratinozytären Zellbiologie dar. Die Anzucht der humanen Zellen auf einen murinen Feeder-Layer bringt jedoch auch einige gravierende Nachteile mit sich. So können beispielsweise tierische Viren und Prionen über den murinen Feeder-Layer auf die humanen Keratinozyten übertragen werden.<sup>91</sup> Diese niemals sicher auszuschließende Verunreinigung der Zellkultur mit infektiösen Partikeln stellt besonders bei der Entwicklung komplexer Hautäquivalente *in vitro* ein großes Problem dar. So macht die Verwendung muriner Zelllinien beispielsweise eine Transplantation von Kunsthaut auf den Menschen noch sehr bedenklich.<sup>103</sup> Auch im Hinblick auf die Verwendung humaner Keratinozyten für komplexe Transfektionsversuche und im Hinblick auf die Charakterisierung dieser Zellen mittels PCR-Studien ist eine Vermischung humaner und muriner Zellen, wie sie bei einer Feeder-Layer-Technik nie gänzlich zu vermeiden ist, ungünstig und kann zu einer Verfälschung der erzielten Ergebnisse führen. Ferner besteht im Hinblick auf einen Einsatz dieser transfizierten Zellen im Rahmen einer zukünftigen Gentherapie die Notwendigkeit einer möglichst vollständigen Elimination nicht humaner Bestandteile aus der Zellkultur. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Form der Keratinozytenkultur verwendet – bei gleicher Effizienz in der Anzucht von humanen Keratinozyten – anstatt der herkömmlichen murinen Feeder-Zellen humane Fibroblasten für die Co-Kultur mit humanen Keratinozyten. Eine Kontamination der Zellkultur mit nicht-humaner DNA über den Feeder-Layer ist somit ausgeschlossen. Ferner stellt diese Form der Co-Kultivierung ein optimales Modell zu Erforschung von Hauterkrankungen mit sowohl dermalen als auch epidermalen Komponente wie der Psoriasis vulgaris dar. Dabei könnten in Zukunft aus einer einzelnen Hautprobe

sowohl psoriatische Fibroblasten als auch Keratinozyten desselben Spenders isoliert werden und in beschriebener Weise co-kultiviert werden. Die Möglichkeit, humane psoriatische Keratinozyten mittels siRNA stabil zu transfizieren und diese anschließend wieder auf Fibroblasten des selben Spenders zu kultivieren, eröffnet, gerade im Hinblick auf die technisch unkomplizierte virale Transfektion humaner Fibroblasten, neue und raffinierte Methoden zur Erforschung der dermal-epidermalen Kommunikation und gegenseitigen Stimulation von Fibroblasten und Keratinozyten in der komplexen Pathogenese der Psoriasis vulgaris. In der Zukunft wäre eine weitere Reduktion des Xenobiotika-Anteils durch die Elimination von FCS aus den Zellmedien wünschenswert. Einige Arbeiten konnten bereits gute Wachstumsraten von rein humanen Fibroblasten-Keratinozyten-Co-Kulturen unter serumfreien Bedingungen aufzeigen.<sup>104,105</sup>

## **5.2. Lentivirale Transfektion humaner Keratinozyten aus psoriatischer Haut**

Die Möglichkeit, die Translation spezifischer Gene in humanen Keratinozyten mittels RNAi zu unterbinden, eröffnet neue Möglichkeiten sowohl für die Erforschung als auch für die Behandlung kutaner Erkrankungen. Dabei stellt die stabile Einbringung der lentiviralen Vektoren in die Zielzellen eine der größten Schwierigkeiten dar, wobei die Überlegenheit lentiviraler Transfektionssysteme gegenüber adeno- oder oncoretroviraler Systeme mehrfach beschrieben wurde.<sup>73,74,78</sup> Die in der Literatur vorgestellten Protokolle beziehen sich jedoch primär auf humane Keratinozyten, welche aus neonatalem Vorhautgewebe isoliert wurden. Mit diesen teilungsfreudigen und einfach zu kultivierenden Keratinozyten können mit bekannten Transfektionsprotokollen Transfektionsraten von mehr als 90% erreicht werden.<sup>73,78</sup> Ein geeignetes Protokoll zur Transfektion humaner adulter Keratinozyten aus psoriatischer Haut wurde jedoch bisher nicht detailliert beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode erzielt Transfektionsraten von über 70% der eingesetzten Keratinozyten. Der translationshemmende Effekt ist mittels RT-PCR erfolgreich nachweisbar. Die eingesetzten Virussuspensionen wiesen Virustiter im Bereich von  $1-5 \times 10^5$  bis  $1-5 \times 10^6$  infektiöser Partikel pro Milliliter auf. Damit waren diese bedeutend niedrigtitriger und weniger infektiös als die in bisher beschriebenen Protokollen verwendeten Suspensionen mit Virustitern bis zu  $10^8$  oder gar  $10^9$

infektiösen Partikeln pro Milliliter.<sup>77,84</sup> Jedoch stellt die Produktion hochtitriger lentiviraler Suspensionen ein sehr anspruchsvolles Verfahren dar, welches in unserer Arbeitsgruppe in einem langfristigen Optimierungsprozess etabliert wurde.<sup>86</sup> Die hier beschriebene Möglichkeit, erfolgreiche Gensuppression an anspruchsvollen humanen Keratinozyten aus psoriatischer Haut mit einer geringen MOI von nur drei Viruspartikeln pro zu infizierender Zelle vorzunehmen, kann in der Zukunft vielen Arbeitsgruppen mit niedrigtitrigen Virussuspensionen das experimentelle Arbeiten wesentlich erleichtern. Für die Erforschung der Psoriasispathogenese eröffnet diese Methode die Möglichkeit, Erkenntnisse über komplexe genetische Kommunikationspfade und Verschaltungen zu erlangen. Dabei stellt die Stabilität der Translationshemmung in den infizierten Zellen und damit die längerfristige Persistenz des siRNA-Effekts eine wesentliche Voraussetzung dar. Um diese Stabilität zu gewährleisten, ist eine möglichst hohe Transfektionsrate zu erzielen, um ein Überwachsen der transfizierten Keratinozyten durch die nicht-transfizierten Zellen, die aufgrund fehlender off-target-Effekte meist einen deutlichen Wachstumsvorteil innehaben, zu verhindern. Zur besseren Abschätzung der Quantität des spezifischen Gensuppressionseffekts sollte dieser neben dem hier durchgeführten alleinigen Vergleich der Bandenfluoreszenz in der RT-PCR zusätzlich mittels quantitativer real time PCR verifiziert werden. Die erfolgreiche Darstellung des langfristigen Transfektionserfolgs sowie der stabilen Translationshemmung ist für die Zukunft essentiell und wird derzeit durch unsere Arbeitsgruppe angestrebt. Jedoch ist es uns mittels der hier etablierten Methode bereits heute möglich, die zumindest kurzfristigen Effekte des siRNA-Effekts zu erforschen, beispielsweise mittels Reverse Transkriptase PCR, Western Blot oder auch mittels Microarray-Analysen, und damit Aussagen über die Funktion der ausgeschalteten Gene zu treffen. Die Möglichkeit, eine stabil lentiviral transfizierte Fibroblasten-Keratinozyten-Co-Kultur aufzubauen, ist durch den hier beschriebenen, erfolgreichen Aufbau der Zellkultur und der Etablierung von zuverlässigen Transfektionsprotokollen für beide Zellarten jedoch bereits aktuell gegeben.

### 5.3. PPAR $\delta$ - ein zentrales und integratives Regulatorgen der Psoriasispathogenese

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf die zentrale Rolle von PPAR $\delta$  in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris.<sup>106,7,23</sup> PPAR $\delta$  selbst ist in läsionaler psoriatischer Haut im Vergleich zu nicht läsionaler Haut und gesunder Kontrollhaut massiv überexprimiert.<sup>42</sup> Dieses Ergebnis konnte durch diese Arbeit mittels RT-PCR und auch mittels Microarray-Analysen bestätigt werden. Deutlich ist gleichfalls die Überexpression von in die PPAR $\delta$ -Signalkaskade eingebundenen Genen wie beispielsweise CRBP 2, FABP 5 und der 12R-Lipoxygenase. Das Aktivitätsprofil von PPAR $\delta$  in humanen Keratinozyten liegt vor allem in der Unterstützung von antiapoptotischen, proangiogenetischen und differenzierungsregulierenden Prozessen. Die Expression von PPAR $\delta$  ist in humanen Fibroblasten und Keratinozyten durch die wichtigsten bekannten zellulären Entzündungsmediatoren TNF $\alpha$  und INF $\alpha$  induzierbar. PPAR $\delta$  wirkt nach dessen Induktion mittels Ligandenstimulation in vitro auf humane Keratinozyten proliferationsfördernd. Diese Wirkung ist jedoch kontrovers diskutiert. In der Literatur finden sich vereinzelt sogar Hinweise auf wachstumsmindernde Eigenschaften von PPAR $\delta$ .<sup>107</sup> Durch klinische Beobachtungen ist eine Zunahme der Schwere einer präexistenten Psoriasis vulgaris unter Therapie mit Interferonderivaten, beispielsweise im Rahmen einer hämatonkologischen Therapie, langjährig bekannt.<sup>108,109</sup> Dieses Phänomen ist nicht allein auf die Psoriasis beschränkt, sondern lässt sich auch an weiteren immunmedierten Hauterkrankungen wie beispielsweise dem Morbus Behçet nachvollziehen.<sup>110</sup> Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Induktion von PPAR $\delta$  durch INF $\alpha$  ein wesentlicher Baustein in der Entstehung der histopathologischen und klinischen Psoriasismerkmale Hyperproliferation, Hyperkeratose und Hypervaskularisation darstellt. Mittlerweile konnte PPAR $\delta$  durch unsere Arbeitsgruppe als Interferonzielgen identifiziert werden.<sup>111</sup> Zu dieser Erkenntnis fügen Ergebnisse meiner Arbeit ergänzend hinzu, dass der bekannte Wachstumsfaktor HB-EGF aus der EGF-Superfamilie ein direktes Zielgen von PPAR $\delta$  ist, wobei durch PPAR $\delta$ -Überexpression eine verstärkte HB-EGF-Expression im Sinne eines positiven Verstärkermechanismus induziert wird. HB-EGF ist seinerseits ein Wachstumsfaktor mit in der Literatur mehrfach beschriebenen kutanen Funktionen. HB-EGF fördert die Keratinozytenproliferation, nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Wundheilung ein und induziert eine epidermale Hyperproliferation.<sup>100,112,113</sup> Dabei

wirkt es unter anderem über die Aktivierung des membranständigen EGF-Rezeptors und sowie von ErbB-Rezeptoren.<sup>112,114</sup> Es kann geschlussfolgert werden, dass die Aktivierung von PPAR $\delta$  und nachfolgend die Induktion von HB-EGF Schlüsselmomente in der Pathogenese der Psoriasis darstellen. Interessanterweise wird HB-EGF in der Literatur bereits als ein mögliches therapeutisches Ziel im Hinblick auf dessen entscheidende Rolle als Wachstumsfaktor von diversen Karzinomen, wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom, diskutiert.<sup>115,116</sup> Dabei werden der synthetische HB-EG-Antagonist CRM197 sowie Anti-HB-EGF-Antikörper als mögliche Agenzien zur Blockade des Wachstumsfaktors genannt. Eine Untersuchung dieser Substanzen auf Wirksamkeit bei der Psoriasis im Sinne einer Inhibierung der HB-EGF medierten Hyperkeratose wäre – auch zur weiteren Unterstützung der in dieser Arbeit vorgestellten zentralen Rolle von HB-EGF – in der Psoriasispathogenese wünschenswert. Primäre humane Keratinozytenkulturen, möglichst aus psoriatischer Haut, deren Etablierung in dieser Arbeit beschrieben ist, bieten dazu das optimale Untersuchungsmodell.

Unsere Microarray-Analysen sowie die Experimente weiterer Arbeitsgruppen zeigten eine Überexpression von in die Fettsäuresignalkaskade involvierten Genen, beispielsweise FABP 5 und CRABP 2. Diese Gene sind Regulatorgene von PPAR $\delta$  und fördern dessen Aktivität. FABP ist ein Regulator der Keratinozytenmotilität in Wunden.<sup>117</sup> Die hochregulierte 12R-Lipoxygenase katalysiert die Bildung von 12R-HETE, einem in psoriatischer Epidermis überexprimierten PPAR $\delta$ -Aktivator.<sup>42</sup> Weitere in die Gruppe der Fettsäuresignalkaskade involvierte Gene umfassen Lipocalin 2, einen durch junB induzierten Modulator der Adipozytendifferenzierung, und DIO2, einen Regulator innerhalb des Stoffwechsels von braunem Fettgewebe.<sup>118,119</sup> Die Carnitin Acyltransferase ist ein Regulator der  $\beta$ -Oxidation. RARRES 1, ein Inhibitor der Keratinozytendifferenzierung, ist in psoriatischen Zellen herunterreguliert.<sup>120</sup> Die ebenfalls minderexprimierte Serin–Threoninkinase ist ein Gegenspieler von PPAR $\delta$  bei der Phosphorylierung von PKB/AKT durch Lipide.<sup>121</sup> In der Zusammenschau dieses Gennetzwerkes mit komplexen Verschaltungen innerhalb der bei Psoriasis krankheitsspezifisch aktivierten Fettsäuresignalkaskade kann die zentrale Regulatorfähigkeit von PPAR $\delta$  in der Adipogenese sowie dem Lipid- und Glykogenstoffwechsel unterstrichen werden. Die Einordnung der Psoriasis als eine einer pathologisch gesteigerten Wundheilung nahestehenden Erkrankung wird durch diese Ergebnisse gestützt.

Diese große Gruppe von psoriasispezifisch hochregulierten und innerhalb der Fettsäuresignalkaskade aktiven Genen unterstützt die These eines pathologisch gesteigerten Fettsäurestoffwechsels als zentralen Aspekt der Psoriasispathogenese neben der bisher im Vordergrund stehenden hauptsächlich hyperinflammatorischen Natur der Krankheit, wobei die Induzierbarkeit von PPAR $\delta$  durch TNF $\alpha$  und INF $\alpha$  eine entscheidende Brücke zwischen diesen beiden zentralen Aspekten der Pathogenese bildet. Im Hinblick auf die pathogenetisch relevante gesteigerte Fettstoffwechselaktivität eröffnet die klinische Beobachtung einer gesteigerten Krankheitsaktivität bei Personen mit erhöhtem BMI<sup>16,15</sup> sowie die gegenüber der Gesamtpopulation deutlich erhöhte Rate von Ausbildungen des metabolischen Syndroms innerhalb der Gruppe der Psoriatiker zahlreiche interessante Aspekte.<sup>12</sup> Wesentliche Bestandteile des metabolischen Syndroms umfassen die periphere Insulinresistenz, Stammfettsucht und Hypercholesterinämie. Diese Faktoren fungieren innerhalb des hier etablierten pathogenetischen Konzepts als Aktivatoren von PPAR $\delta$  und sind wesentlich an der Bildung eines Mikromilieus mit gesteigerter PPAR $\delta$ -Aktivität beteiligt und tragen demnach selbst erheblich zur Ausbildung und zur Schwere des psoriatischen Phänotyps bei. Neben diesen chronisch vorhandenen Verstärkern der Psoriasis stellen lokale und generalisierte akute Entzündungsprozesse sowie Stresssituationen die wichtigsten bekannten Trigger von Psoriasiserschüben dar. Die gesteigerte Aktivität von TNF $\alpha$  und INF $\alpha$  führt wiederum zu einer gesteigerten Expression von PPAR $\delta$  über die stress-activated kinase.<sup>41</sup> Die pathologisch gesteigerte PPAR $\delta$ -Aktivität stellt somit ein integrales Element der Psoriasispathogenese dar und verbindet sowohl die unterschiedlichen pathogenetischen Konzepte als auch die krankheitsspezifischen, transkriptionellen Veränderungen in psoriatischer Haut.

#### **5.4. PPAR $\delta$ -Blockade als mögliche antipsoriatische Therapieoption**

Besonders wertvoll ist die Etablierung der zentralen Rolle von PPAR $\delta$  in der Psoriasispathogenese auch im Hinblick auf die sich aus dieser ergebenden vielseitigen therapeutischen Konsequenzen. Die positiven Auswirkungen einer vorsichtigen Kalorienrestriktion auf die Psoriasis sind klinisch bekannt und werden innerhalb ganzheitlicher Therapiekonzepte bereits an ausgewählten Patienten genutzt.<sup>122</sup> Die klinische Anwendung von spezifischen PPAR $\gamma$ -Agonisten im Rahmen

von Therapieregimen beim Diabetes mellitus Typ 2 und beim metabolischen Syndrom sollten auch im Hinblick auf eine Wirksamkeit bei Psoriasis getestet werden. Die Wirksamkeit dieser PPAR $\gamma$ -Agonisten, die entsprechend der entgegengesetzten Wirkung der beiden PPAR-Isoformen als PPAR $\delta$  – Antagonisten wirken, wird dabei hauptsächlich auf eine Inhibierung der zytoplasmatischen Aktivität der ERK-Aktivität zurückgeführt. Die klinische Wirksamkeit dieser sogenannten Glitazone mit den Leitsubstanzen Pioglitazon und Rosiglitazon sowohl bei Plaque-Psoriasis als auch bei Psoriasisarthritis konnte bereits in klinischen Studien gezeigt werden.<sup>20,123,124</sup> Eine Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus dieser Substanzen im Hinblick auf eine Induktion einer verminderten Expression und Aktivität von PPAR $\delta$  sollte in Zukunft durchgeführt werden. Besonders im Hinblick auf die in den genannten Studien proklamierte gute Verträglichkeit der Substanzen sollten weitere Forschungsbemühungen unternommen werden, um Aussagen über eine generelle Anwendungsempfehlung dieser Substanzen bei Patienten mit metabolischem Syndrom und Psoriasis zu generieren und damit die bestehenden Behandlungsleitlinien zu erweitern. PPAR $\delta$  stellt somit im Hinblick auf neue Therapieoptionen bei Psoriasis ein zentrales Regulatorgen dar. Auch die allseits akzeptierte und wissenschaftlich mehrfach belegte hervorragende Wirksamkeit von TNF $\alpha$ -Antagonisten bei schwerer Plaque-Psoriasis und Psoriasisarthritis kann mittels der aus der TNF $\alpha$ -Suppression resultierenden Aktivitätsminderung von PPAR $\delta$  erklärt werden. Die therapeutische Überlegenheit dieser sogenannten Biologika ist demnach teilweise auch auf deren funktionellen PPAR $\delta$ -Antagonismus zurückzuführen.

Auch im Hinblick auf die gute Wirksamkeit des topisch verwendeten Dithranol-Derivates 1,8-Dihydroxy-9-anthron (Anthralin) kann ein funktioneller PPAR $\delta$ -Antagonismus postuliert werden. Das Enzym 12-R-Lipoxygenase bewirkt die Bildung von 12-R-HETE, einem anerkanntem PPAR $\delta$ -Aktivator. Anthralin wiederum katalysiert die Inhibierung der 12-R-Lipoxygenase und bewirkt damit, über die verminderte Konzentration an 12-R-HETE, eine Abschwächung der PPAR $\delta$ -Aktivität.<sup>125</sup> PPAR $\delta$  steht somit im Mittelpunkt zahlreicher erfolgreicher topischer und systemischer Psoriasis-therapeutika und stellt eines der wichtigsten Zielgene bei der Entwicklung neuer Antipsoriatika dar.

Auch die telomerisch nur 4,2Mb von der bekannten PSORS1-Mutation im HLA $\alpha$ C auf Chromosom 6p21.2 entfernte Lokalisation von PPAR $\delta$  im Genom stellt einen

interessanten Aspekt dar. Genomweite Screeninguntersuchungen auf Psoriasis-suszeptibilitätsloki mittels Mikrosatellitentechnik zeigen im Gebiet des PPAR $\delta$ -Gens deutliche Aktivität.<sup>126-128</sup> PPAR $\delta$  ist somit ein weiteres vielversprechendes Kandidatengen für die Psoriasis und sollte auf eine Beteiligung an der PSORS1-Mutation hin untersucht werden. Die weitere Erforschung von PPAR $\delta$  in der molekularbiologischen Pathogenese sowie in der Genetik der Psoriasis vulgaris stellt einen der hoffnungsvollsten Ansätze zu weiteren Entschlüsselung dieser in ihrer Komplexität und Morbidität einzigartigen Erkrankungen des Menschen dar.

### **5.5. Bedeutung der regulatorischen Verbindung zwischen PPAR $\delta$ und HB-EGF in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris**

Die fokale Hyperkeratose, also die massive Verdickung der Epidermis durch eine stark gesteigerte Keratinozytenproliferation in psoriatischen Plaques, ist das histologische Leitsymptom der Psoriasis. Es ist anzunehmen, dass die PPAR $\delta$ -bedingte Expressionssteigerung von HB-EGF ein Schlüsselereignis in der Entstehung der psoriatischen Hyperkeratose darstellt.

Ebenfalls bekannt ist, dass die Expression von HB-EGF in artifiziell durch Kratzen erzeugten Wunden sofort stark ansteigt. HB-EGF gilt als einer der wichtigsten epidermalen Wachstumsfaktoren während der Wundheilung und besitzt reepithelisationsfördernde Wirkung durch Steigerung von Keratinozytenmigration und –proliferation.<sup>113</sup>

Über die Rolle von HB-EGF in der Pathogenese der Psoriasis konnten bisher nur wenige gesicherte Aussagen gemacht werden. Die Überexpression in psoriatischer Haut ist bekannt und konnte auch durch die Ergebnisse des Microarrays Affymetrix U95A, welche im Vorfeld durch meine Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, bestätigt werden. Der Microarray U95A zeigte eine um den Faktor 3,6 vermehrte Expression von HB-EGF in läsionalen versus nicht-läsionalen psoriatischen Keratinozyten. Der in dieser Arbeit durchgeführte PIQUOR SkinPatho Microarray zeigte eine etwa um den Faktor 2 gesteigerte Expression von HB-EGF in primären Keratinozyten nach Stimulation mit dem PPAR $\delta$ -Aktivator L-165041. Durch die Ergebnisse des PIQUOR SkinPatho Microarray kann nun hinzugefügt werden, dass die Überexpression von HB-EGF in psoriatischer Haut mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Resultat der gesteigerten PPAR $\delta$ -Aktivität darstellt.

Auch dem Transkriptionsfaktor PPAR $\delta$  wird eine überaus wichtige Funktion als proliferationsförderndes Element während der Wundheilung zugeschrieben. Die Beobachtung, dass PPAR $\delta$ -defiziente Mäuse eine gestörte Wundheilung aufweisen,<sup>38</sup> kann nun durch eine verminderte Fähigkeit der Expression von HB-EGF erklärt werden. Über eine Beteiligung von HB-EGF an der Entstehung des K $\ddot{o}$ bner-Phänomens wurde bereits spekuliert.<sup>129</sup> Meine Sichtweise der Psoriasispathogenese als ein einer überschießenden Wundreaktion ähnliches Geschehen wird durch meine Ergebnisse ebenfalls unterstützt.

Die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors PPAR $\delta$  für die Pathogenese der Psoriasis konnte durch meine Forschungsergebnisse bestätigt werden. Sowohl die Induktion eines gesteigerten und dysregulierten Fettstoffwechsels als auch des klinisch führenden Phänomens der epidermalen Hyperproliferation können nunmehr als PPAR $\delta$ -induziert bezeichnet werden.

Die Beobachtung, dass sich die Proliferation von HaCat-Keratinocyten mittels PPAR $\delta$ -Knock-down hemmen lässt, qualifiziert PPAR $\delta$  als mögliches Angriffsziel einer antipsoriatischen Therapie in der Zukunft.

*Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Journal of Investigative Dermatology publiziert (Romanowska et al., 2008).<sup>17</sup>*

## 6. Zusammenfassung

Der Peroxisome proliferator activator receptor delta (PPAR $\delta$ ) ist ein nukleärer Rezeptor aus der Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren. Die molekularen Funktionen von PPAR $\delta$  sind komplex und beinhalten sowohl die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, die Differenzierung humaner epithelialer Stammzellen als auch die Proliferation von humanen Keratinozyten. Hinsichtlich einer Schlüsselfunktion von PPAR $\delta$  in der Differenzierung humaner Keratinozyten und einer möglichen Beteiligung des Rezeptors an der Pathogenese der Psoriasis vulgaris finden sich in der Fachliteratur seit Ende der 1990er Jahre gesicherte Ergebnisse.

Zur genaueren experimentellen Untersuchung der Funktion von PPAR in der Psoriasispathogenese wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit eine Co-Zellkultur aus humanen Fibroblasten als Feeder-Layer und humanen Keratinozyten aus psoriatischer Haut etabliert. Dabei wurde das allgemein gängige Kulturverfahren nach Rheinwald und Green durch den bewussten Verzicht auf murine Fibroblasten als Feeder-Layer-Zellen modifiziert und optimiert. Diese Zellkultur wurde nachfolgend verwendet, um die funktionelle Rolle von PPAR $\delta$  in primären Keratinozyten zu untersuchen. Hierzu wurden primäre Keratinozyten mit einem spezifischen Liganden für PPAR $\delta$  aktiviert und daraufhin die globale Genexpression mittels Mikroarray Analysen bestimmt. Dabei konnte die metabolische Funktion von PPAR $\delta$  in Keratinozyten anhand der aktivierten Zielgene nachgewiesen werden. Weiterhin wurde der Transkriptionsfaktor Heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF) als Zielgen von PPAR $\delta$  identifiziert. Somit konnte PPAR $\delta$  als Mitverursacher der langjährig bekannten Überexpression von HB-EGF in psoriatischer Epidermis und der durch diese induzierten keratinozytären Hyperproliferation charakterisiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von PPAR $\delta$  als Schlüsselregulator bei der Übersetzung des vor allem durch T-Lymphozyten erzeugten entzündlichen Mikromilieus innerhalb der Epidermis in den typischen kutanen psoriatischen Phänotyp hin. Ferner wurde eine Methode zur Transduktion von humanen Keratinozyten aus psoriatischer Haut mit lentiviralen shRNA-tragenden Vektoren etabliert. Mittels des hier vorgestellten Protokolls zur lentiviralen Transfektion können bei primären psoriatischen Keratinozyten Transduktionsraten von über 70% erreicht werden, wobei die zur Transfektion eingesetzten Virussuspensionen Titer bis zu  $10^6$  Viren pro ml aufwiesen. Die erfolgreiche Einbringung und Expression der shRNA in die Keratinozyten konnte

auch funktionell mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die Etablierung einer Methode zur erfolgreichen Transduktion primärer humaner Keratinozyten mittels niedrigtitrigen Virususpensionen erlaubt eine effektive Anwendung dieser Methode ohne Aufkonzentration der Virusüberstände.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ALOX-12</b>	Arachidonate 12-Lipoxygenase
<b>AP-1</b>	Aktivator-Protein 1
<b>APC</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>Aq. dest</b>	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
<b>AT</b>	Annealing Temperatur
<b>BLAST®</b>	basic local alignment search tool
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BMI</b>	Körpermasseindex (Body Mass Index)
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>CCHCR-1</b>	Coiled-coil alpha-helical rod protein1
<b>cDNA</b>	Komplementär-DNA (complementary DNA)
<b>Chr.</b>	Chromosom
<b>CRABP-2</b>	cellular retinoic acid binding protein2
<b>Cy3</b>	Cyanine 3
<b>Cy5</b>	Cyanine 5
<b>DAEA</b>	Diethylaminoethyl-Dextran
<b>DC-Cells</b>	Dendritische Zellen (dendritic cells)
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DIO-2</b>	death inducer-obliterator 2
<b>DMEM</b>	Dulbecco`s modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>dUTP</b>	Desoxyuridintriphosphat
<b>ds</b>	Doppelstrang (double strand)

<b>EB</b>	Epidermolysis bullosa
<b>ECGF</b>	Epithelial cell growth factor
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>Erb-1</b>	Estrogen receptor beta 1
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated protein kinase
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FABP 5</b>	Fatty Acid binding Protein 5
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorter
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
<b>for</b>	Vorwärts kodierend (forward)
<b>G</b>	Guanin
<b>GAIN</b>	Genetic association Information Network
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
<b>GM-CSF</b>	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogensynthase-kinase 3beta
<b>HB-EGF</b>	Heparine binding epidermal growth factor
<b>HeLa</b>	Helen Lane Cervixkarzinomzellen (permanente Zelllinie)
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HLA</b>	Humane Leukozytenantigen
<b>Hpa 1</b>	Restriktionsenzym Hpa1
<b>ICAM-1</b>	Intracellular adhesion moleküle 1
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferon alpha
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILK</b>	Integrine linked Kinase
<b>IRF-2</b>	INF regulatory factor 2
<b>kb</b>	Kilobase
<b>L</b>	Läsional (lesional)

	late cornified envelope
<b>LCE</b>	<a href="http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=16612">http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=16612</a>
<b>Mb</b>	Megabasen
<b>MCP-1</b>	monocyte chemotactic protein-1
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
<b>M-MLV-RT</b>	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>NL</b>	Nicht läsional (non lesional)
<b>NF-kappa B</b>	nuclear factor-kappa B
<b>NHR</b>	Nuclear Hormone Receptor
<b>No.</b>	Nummer
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>p-bodies</b>	p-Körperchen (processing-bodies)
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PDEGF</b>	platelet-derived epidermal growth factor
<b>PKD-1</b>	3-phosphoinostide dependent kinase-1
<b>pH</b>	potentia Hydrogenii
<b>pLL3.7</b>	pLenti Lox 3.7 (Transfervektor)
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator activator receptor
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator activator receptor alpha
<b>PPAR<math>\beta</math></b>	Peroxisome proliferator activator receptor beta
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome proliferator activator receptor gamma
<b>PPAR<math>\delta</math></b>	Peroxisome proliferator activator receptor delta
<b>PPRE</b>	PPAR-Responsive Elements
<b>PSORS1</b>	Psoriasis-Suszeptibilitätslocus 1
<b>RARRS 1</b>	Retinoic acid receptor responder protein 1
<b>RF</b>	Reinheitsfaktor
<b>12-R-HETE</b>	12(R)-Hydroxy-5(Z),8(Z),10(E),14(Z)-eicosatetraenoic acid
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure

<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Retinoid X Rezeptor alpha
<b>SCDF</b>	Stromal Cell derived Factor
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA
<b>siRNA</b>	Short interfering RNA
<b>Smad 3/4</b>	SMAD family member 3/4
<b>SP</b>	Standardprotokoll
<b>SPRP2c</b>	ser-protease-related protein 2c
<b>ss</b>	Einzelstrang (single strand)
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>SYC</b>	small inducible cytokine
<b>T</b>	Thymin
<b>TBE</b>	Tris-boric acid-EDTA buffer
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Transforming growth factor alpha
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	Transforming growth factor beta 1
<b>Th-17</b>	T-Helferzellen 17
<b>TCF / LEF</b>	lymphoid enhancer-binding factor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor alpha
<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>VF</b>	Verdünnungsfaktor
<b>WNT 5a</b>	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
<b>Xho 1</b>	Restriktionsenzym Xho 1
<b>XP</b>	Xeroderma pigmentosa
<b>ZP</b>	Zentrifugationsprotokoll

## 8. Literaturverzeichnis

1. Schön, M.P. & Boehncke, W.-H. Psoriasis. *N. Engl. J. Med* **352**, 1899-1912 (2005).
2. Nair, R.P. u. a. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat. Genet* **41**, 199-204 (2009).
3. Fritsch, P. *Dermatologie und Venerologie. Grundlagen. Klinik. Atlas.* (Springer, Berlin: 2003).
4. Lowes, M.A., Bowcock, A.M. & Krueger, J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* **445**, 866-873 (2007).
5. Wrone-Smith, T. & Nickoloff, B.J. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J. Clin. Invest* **98**, 1878-1887 (1996).
6. Tan, N.S., Michalik, L., Di-Poï, N., Desvergne, B. & Wahli, W. Critical roles of the nuclear receptor PPARbeta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta) in skin wound healing. *Biochem. Soc. Trans* **32**, 97-102 (2004).
7. Michalik, L. & Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 991-998 (2007).
8. Tiilikainen, A., Lassus, A., Karvonen, J., Vartiainen, P. & Julin, M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br. J. Dermatol* **102**, 179-184 (1980).
9. Valdimarsson, H. The genetic basis of psoriasis. *Clin. Dermatol* **25**, 563-567 (2007).
10. Nair, R.P. u. a. Psoriasis bench to bedside: genetics meets immunology. *Arch Dermatol* **145**, 462-464 (2009).
11. de Cid, R. u. a. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat. Genet* **41**, 211-215 (2009).
12. Sommer, D.M., Jenisch, S., Suchan, M., Christophers, E. & Weichenthal, M. Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with moderate to severe psoriasis. *Arch. Dermatol. Res* **298**, 321-328 (2006).
13. Tobin, A.-M. u. a. Cardiovascular disease and risk factors in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Rheumatol* **37**, 1386-1394 (2010).
14. Sterry, W., Strober, B.E. & Menter, A. Obesity in psoriasis: the metabolic, clinical and therapeutic implications. Report of an interdisciplinary conference and review. *Br. J. Dermatol* **157**, 649-655 (2007).
15. Marino, M.G. u. a. Risk factors for psoriasis: a retrospective study on 501 outpatients clinical records. *Ann Ig* **16**, 753-758 (2004).
16. Naldi, L. u. a. Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study. *J. Invest. Dermatol* **125**, 61-67 (2005).
17. Romanowska, M. u. a. PPARdelta enhances keratinocyte proliferation in psoriasis and induces heparin-binding EGF-like growth factor. *J. Invest. Dermatol* **128**, 110-124 (2008).
18. Hamminga, E.A., van der Lely, A.J., Neumann, H.A.M. & Thio, H.B. Chronic inflammation in psoriasis and obesity: implications for therapy. *Med. Hypotheses* **67**, 768-773 (2006).
19. Hirai, S. u. a. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm* **2010**, 367838 (2010).
20. Boyd, A.S. Thiazolidinediones in dermatology. *Int. J. Dermatol* **46**, 557-563 (2007).
21. Yamauchi, T. & Kadowaki, T. [The molecular mechanisms by which PPAR gamma/RXR inhibitors improve insulin resistance]. *Nippon Rinsho* **59**, 2245-2254 (2001).
22. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650 (1990).
23. Kuenzli, S. & Saurat, J.-H. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br. J. Dermatol* **149**, 229-236 (2003).
24. Yessoufou, A. & Wahli, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly* **140**, w13071 (2010).
25. Pyper, S.R., Viswakarma, N., Yu, S. & Reddy, J.K. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal* **8**, e002 (2010).
26. Tontonoz, P. & Spiegelman, B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem* **77**, 289-312 (2008).

27. Botton, T. u. a. In vitro and in vivo anti-melanoma effects of ciglitazone. *J. Invest. Dermatol* **129**, 1208-1218 (2009).
28. Mansure, J.J., Nassim, R. & Kassouf, W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target. *Cancer Biol. Ther* **8**, 6-15 (2009).
29. Wahli, W. A gut feeling of the PXR, PPAR and NF-kappaB connection. *J. Intern. Med* **263**, 613-619 (2008).
30. Schadendorf, D. Peroxisome proliferator-activating receptors: a new way to treat melanoma? *J. Invest. Dermatol* **129**, 1061-1063 (2009).
31. Wang, L.H. u. a. Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity* **20**, 205-218 (2004).
32. Sano, S. u. a. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med* **11**, 43-49 (2005).
33. Wagner, K.-D. & Wagner, N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol. Ther* **125**, 423-435 (2010).
34. Bishop-Bailey, D. & Bystrom, J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol. Ther* **124**, 141-150 (2009).
35. Short, B. Time (and PPAR beta/delta) heals all wounds. *J. Cell Biol* **184**, 767 (2009).
36. Tan, N.S., Michalik, L., Di-Poï, N., Desvergne, B. & Wahli, W. Critical roles of the nuclear receptor PPARbeta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta) in skin wound healing. *Biochem. Soc. Trans* **32**, 97-102 (2004).
37. Di-Poï, N., Michalik, L., Tan, N.S., Desvergne, B. & Wahli, W. The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* **85**, 257-265 (2003).
38. Michalik, L. u. a. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J. Cell Biol* **154**, 799-814 (2001).
39. Billoni, N. u. a. Expression of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) in human hair follicles and PPAR alpha involvement in hair growth. *Acta Derm. Venereol* **80**, 329-334 (2000).
40. Rosenfield, R.L., Kentsis, A., Deplewski, D. & Ciletti, N. Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Invest. Dermatol* **112**, 226-232 (1999).
41. Tan, N.S. u. a. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* **15**, 3263-3277 (2001).
42. Westergaard, M. u. a. Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor kappaB in normal and lesional psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol* **121**, 1104-1117 (2003).
43. Westergaard, M. u. a. Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J. Invest. Dermatol* **116**, 702-712 (2001).
44. Icre, G., Wahli, W. & Michalik, L. Functions of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and beta in skin homeostasis, epithelial repair, and morphogenesis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc* **11**, 30-35 (2006).
45. Piqueras, L. u. a. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **27**, 63-69 (2007).
46. Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Honoré, B. & Celis, J.E. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J. Invest. Dermatol* **99**, 299-305 (1992).
47. Siegenthaler, G. u. a. Expression of CRABP-I and -II in human epidermal cells. Alteration of relative protein amounts is linked to the state of differentiation. *Biochem. J* **287 ( Pt 2)**, 383-389 (1992).
48. Zhou, X. u. a. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol. Genomics* **13**, 69-78 (2003).
49. Thuillier, P. u. a. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-mediated keratinocyte differentiation by lipoxygenase inhibitors. *Biochem. J* **366**, 901-910 (2002).
50. Sterry, W. u. a. Biological therapies in the systemic management of psoriasis: International Consensus Conference. *Br. J. Dermatol* **151 Suppl 69**, 3-17 (2004).
51. Jarvis, M.C., Gray, T.J.B. & Palmer, C.N.A. Both PPARgamma and PPARdelta influence sulindac sulfide-mediated p21WAF1/CIP1 upregulation in a human prostate epithelial cell line. *Oncogene* **24**, 8211-8215 (2005).
52. Malhotra, S., Bansal, D., Shafiq, N., Pandhi, P. & Kumar, B. Potential therapeutic role of peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists in psoriasis. *Expert Opin Pharmacother* **6**, 1455-1461 (2005).
53. Jinquan, T. u. a. Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J. Invest. Dermatol* **107**, 5-10 (1996).

54. Rheinwald, J.G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-343 (1975).
55. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
56. Chuaqui, R. u. a. Analysis of mRNA quality in freshly prepared and archival Papanicolaou samples. *Acta Cytol* **43**, 831-836 (1999).
57. Debouck, C. & Metcalf, B. The impact of genomics on drug discovery. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **40**, 193-207 (2000).
58. Chakravarti, A. Population genetics--making sense out of sequence. *Nat. Genet* **21**, 56-60 (1999).
59. Maas, K. u. a. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J. Immunol* **169**, 5-9 (2002).
60. Pick, E., McCarthy, M.M. & Kluger, H.M. Assessing expression of apoptotic markers using large cohort tissue microarrays. *Methods Mol. Biol* **414**, 83-93 (2008).
61. Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 14863-14868 (1998).
62. Chaudhuri, J.D. Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. *Med. Sci. Monit* **11**, RA52-62 (2005).
63. Kunz, M. u. a. DNA microarray technology and its applications in dermatology. *Exp. Dermatol* **13**, 593-606 (2004).
64. Winnepenninckx, V. u. a. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J. Natl. Cancer Inst* **98**, 472-482 (2006).
65. Bowcock, A.M. u. a. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum. Mol. Genet* **10**, 1793-1805 (2001).
66. Oestreicher, J.L. u. a. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J* **1**, 272-287 (2001).
67. Kulski, J.K. u. a. Gene expression profiling of Japanese psoriatic skin reveals an increased activity in molecular stress and immune response signals. *J. Mol. Med* **83**, 964-975 (2005).
68. Gu, J. u. a. A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients. *Rheumatology (Oxford)* **41**, 759-766 (2002).
69. Manolio, T.A. u. a. New models of collaboration in genome-wide association studies: the Genetic Association Information Network. *Nat. Genet* **39**, 1045-1051 (2007).
70. Scherer, L.J. & Rossi, J.J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol* **21**, 1457-1465 (2003).
71. Verma, I.M. & Weitzman, M.D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem* **74**, 711-738 (2005).
72. Singer, O. & Verma, I.M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* **8**, 483-488 (2008).
73. Serrano, F. u. a. A comparison of targeting performance of oncoretroviral versus lentiviral vectors on human keratinocytes. *Hum. Gene Ther* **14**, 1579-1585 (2003).
74. Gagnoux-Palacios, L. u. a. Assessment of optimal transduction of primary human skin keratinocytes by viral vectors. *J Gene Med* **7**, 1178-1186 (2005).
75. Scherr, M. & Eder, M. Modulation of gene expression by siRNA in hematopoietic cells. *Curr Opin Drug Discov Devel* **8**, 262-269 (2005).
76. Lever, A.M.L., Strappe, P.M. & Zhao, J. Lentiviral vectors. *J. Biomed. Sci* **11**, 439-449 (2004).
77. Kuhn, U., Terunuma, A., Pflutzner, W., Foster, R.A. & Vogel, J.C. In vivo assessment of gene delivery to keratinocytes by lentiviral vectors. *J. Virol* **76**, 1496-1504 (2002).
78. Chen, M., Li, W., Fan, J., Kasahara, N. & Woodley, D. An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Clin. Exp. Dermatol* **28**, 193-199 (2003).
79. Reischl, J. u. a. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol* **127**, 163-169 (2007).
80. Gudjonsson, J.E. u. a. Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol* **130**, 1849-1859 (2010).
81. Romanowska, M. u. a. Wnt5a exhibits layer-specific expression in adult skin, is upregulated in psoriasis, and synergizes with type 1 interferon. *PLoS ONE* **4**, e5354 (2009).
82. Witze, E.S., Litman, E.S., Argast, G.M., Moon, R.T. & Ahn, N.G. Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science* **320**, 365-369 (2008).

83. Takada, I. u. a. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat. Cell Biol* **9**, 1273-1285 (2007).
84. Rubinson, D.A. u. a. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet* **33**, 401-406 (2003).
85. Salmon, P. & Trono, D. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 4**, Unit 4.21 (2006).
86. al Yacoub, N., Romanowska, M., Haritonova, N. & Foerster, J. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *J Gene Med* **9**, 579-584 (2007).
87. Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.-O., Trono, D. & Aebischer, P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods* **3**, 109-116 (2006).
88. BLAST Human Sequences. auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>>
89. siDesign-Center. auf <http://www.dharmacon.com/designcenter/designcenterpage.aspx>>
90. Karecla, P.I., Timpl, R. & Watt, F.M. Adhesion of human epidermal keratinocytes to laminin. *Cell Adhes. Commun* **2**, 309-318 (1994).
91. Bullock, A.J., Higham, M.C. & MacNeil, S. Use of human fibroblasts in the development of a xenobiotic-free culture and delivery system for human keratinocytes. *Tissue Eng* **12**, 245-255 (2006).
92. Eves, P.C., Beck, A.J., Shard, A.G. & Mac Neil, S. A chemically defined surface for the co-culture of melanocytes and keratinocytes. *Biomaterials* **26**, 7068-7081 (2005).
93. Liu, S.C. & Parsons, C.S. Serial cultivation of epidermal keratinocytes from psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol* **81**, 54-61 (1983).
94. Albrecht, G. [Undesirable skin reactions to lithium]. *Hautarzt* **36**, 77-82 (1985).
95. He, T.C., Chan, T.A., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**, 335-345 (1999).
96. Liang, P.-fei u. a. [The role of PPARbeta in the apoptotic HaCaT keratinocytes induced by TNF-alpha]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **87**, 2144-2148 (2007).
97. Lewis, P.F. & Emerman, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol* **68**, 510-516 (1994).
98. Tachibana, K. u. a. Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms. *Nucl. Recept* **3**, 3 (2005).
99. Tanaka, T. u. a. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 15924-15929 (2003).
100. Zheng, Y. u. a. Alteration and significance of heparin-binding epidermal-growth-factor-like growth factor in psoriatic epidermis. *Dermatology (Basel)* **207**, 22-27 (2003).
101. Piepkorn, M., Pittelkow, M.R. & Cook, P.W. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J. Invest. Dermatol* **111**, 715-721 (1998).
102. Hashimoto, K. u. a. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J. Biol. Chem* **269**, 20060-20066 (1994).
103. Notara, M., Haddow, D.B., MacNeil, S. & Daniels, J.T. A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med* **2**, 919-927 (2007).
104. Higham, M.C. u. a. Development of a stable chemically defined surface for the culture of human keratinocytes under serum-free conditions for clinical use. *Tissue Eng* **9**, 919-930 (2003).
105. Sun, T. u. a. Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use. *Wound Repair Regen* **12**, 626-634 (2004).
106. Sertznig, P., Seifert, M., Tilgen, W. & Reichrath, J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin: importance of PPARs in skin physiology and dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol* **9**, 15-31 (2008).
107. Burdick, A.D. u. a. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. *Cell. Signal* **19**, 1163-1171 (2007).
108. Ladoyanni, E. & Nambi, R. Psoriasis exacerbated by interferon-alpha in a patient with chronic myeloid leukemia. *J Drugs Dermatol* **4**, 221-222 (2005).
109. Wölfer, L.U., Goerdts, S., Schröder, K., Zouboulis, C.C. & Orfanos, C.E. [Interferon-alpha-induced psoriasis vulgaris]. *Hautarzt* **47**, 124-128 (1996).

110. Raanani, P. & Ben-Bassat, I. Immune-mediated complications during interferon therapy in hematological patients. *Acta Haematol* **107**, 133-144 (2002).
111. al Yacoub, N., Romanowska, M., Krauss, S., Schweiger, S. & Foerster, J. PPARdelta is a type 1 IFN target gene and inhibits apoptosis in T cells. *J. Invest. Dermatol* **128**, 1940-1949 (2008).
112. Kimura, R., Iwamoto, R. & Mekada, E. Soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor contributes to retinoic acid-induced epidermal hyperplasia. *Cell Struct. Funct* **30**, 35-42 (2005).
113. Shirakata, Y. u. a. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J. Cell. Sci* **118**, 2363-2370 (2005).
114. Varani, J. u. a. Heparin-binding epidermal-growth-factor-like growth factor activation of keratinocyte ErbB receptors Mediates epidermal hyperplasia, a prominent side-effect of retinoid therapy. *J. Invest. Dermatol* **117**, 1335-1341 (2001).
115. Yagi, H., Yotsumoto, F. & Miyamoto, S. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes transcoelomic metastasis in ovarian cancer through epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cancer Ther* **7**, 3441-3451 (2008).
116. Miyamoto, S. u. a. Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res* **64**, 5720-5727 (2004).
117. Kusakari, Y. u. a. Decreased keratinocyte motility in skin wound on mice lacking the epidermal fatty acid binding protein gene. *Mol. Cell. Biochem* **284**, 183-188 (2006).
118. Florin, L. u. a. Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin. *J. Invest. Dermatol* **126**, 902-911 (2006).
119. Christoffolete, M.A. u. a. Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* **53**, 577-584 (2004).
120. DiSepio, D. u. a. Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 14811-14815 (1998).
121. Wick, M.J., Dong, L.Q., Riojas, R.A., Ramos, F.J. & Liu, F. Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J. Biol. Chem* **275**, 40400-40406 (2000).
122. Masternak, M.M. u. a. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/binding protein knockout mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci* **60**, 1238-1245 (2005).
123. Varani, J., Bhagavathula, N., Ellis, C.N. & Pershadsingh, H.A. Thiazolidinediones: potential as therapeutics for psoriasis and perhaps other hyperproliferative skin disease. *Expert Opin Investig Drugs* **15**, 1453-1468 (2006).
124. Robertshaw, H. & Friedmann, P.S. Pioglitazone: a promising therapy for psoriasis. *Br. J. Dermatol* **152**, 189-191 (2005).
125. Müller, K., Huang, H.S. & Wiegrebe, W. Antipsoriatic anthrones with modulated redox properties. 3. 10-thio-substituted 1,8-dihydroxy-9(10H)-anthracenones as inhibitors of keratinocyte growth, 5-lipoxygenase, and the formation of 12(S)-HETE in mouse epidermis. *J. Med. Chem* **39**, 3132-3138 (1996).
126. Nair, R.P. u. a. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum. Mol. Genet* **6**, 1349-1356 (1997).
127. Trembath, R.C. u. a. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum. Mol. Genet* **6**, 813-820 (1997).
128. Enlund, F. u. a. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur. J. Hum. Genet* **7**, 783-790 (1999).
129. Hashimoto, K. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J. Dermatol. Sci* **24 Suppl 1**, S46-50 (2000).

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. John Foerster für die Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas und für alles, was er mir über wissenschaftlich-experimentelles Arbeiten beigebracht hat.

Mein Dank gilt auch meinen Laborkolleginnen Frau Dr. rer. nat. Nadya Al Yacoub und Frau Dr. rer. nat. Malgorzata Romanowska für Ihre praktische Hilfestellung bei der Laborarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Metin Artuc für seine Hilfe beim Aufbau der Keratinozytenkultur.

Meine tief empfundene Dankbarkeit und Liebe gilt meinen Eltern, meinem Zwilling Bruder Christoph und meinem Freund Joost.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Hannah Friederike Gerken, an Eides statt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie Literatur vollständig angegeben sind.

---

Hannah Friederike Gerken

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.